

Aus der Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Einwanderung und Differenzierung von hämatogenen Zellen zu Mikroglia im adulten Zentralnervensystem – eine qualitative und semiquantitative Studie in Mäusen unter Verwendung des grünen fluoreszierenden Proteins

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Tim Wehner
aus Georgsmarienhütte

Dekan: Prof. Dr. med. J. W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. A. Faissner

2. Prof. Dr. G. Stoll

3. PD Dr. J. Priller

Datum der Promotion: 26. Januar 2004

Zusammenfassung

Zur langfristigen Markierung von hämatogenen Zellen wurde Knochenmark mit dem Gen für das grüne fluoreszierende Protein (GFP) transduziert und in bestrahlte Empfängermäuse transplantiert. Die GFP-Expression im peripheren Blut dieser Tiere war über den untersuchten Zeitraum von vier Monaten stabil. Die Hirne der Empfängertiere wurden zu den Zeitpunkten zwei, vier, acht und fünfzehn Wochen nach Knochenmarktransplantation auf die Präsenz von GFP-exprimierenden Zellen untersucht. Es fand sich eine im Zeitverlauf zunehmende Einwanderung und Differenzierung von GFP-exprimierenden hämatogenen Zellen zu ramifizierten Mikrogliazellen in der grauen und weißen Substanz. Nach vier Monaten stammten bis zu ein Viertel aller regionalen Mikrogliazellen aus dem transplantierten Knochenmark. Nach fokaler cerebraler Ischämie wanderten deutlich mehr GFP-positive Zellen aus dem Blut in das ischämische Areal ein und differenzierten zu ramifizierten Mikrogliazellen. Diese Ergebnisse implizieren einen Weg für den Transfer des humanen Immunodefizienzvirus in das Zentralnervensystem und offerieren einen nichtinvasiven Weg, genetisch manipulierte Zellen in das adulte Hirnparenchym einzuschleusen.

Schlagworte:

Knochenmarkchimären

GFP

fokale cerebrale Ischämie

Maus

Mikroglia

Transduktion

Abstract

In order to stably label hematogenous cells, bone marrow was transduced with the gene for the green fluorescent protein (GFP) and transplanted into irradiated recipient mice. The GFP-expression in peripheral blood cells of these animals was stable within the examined time frame of four months. Brains of recipient animals were examined for the presence of GFP-expressing cells at two, four, eight and fifteen weeks after bone marrow transplantation. An increasing migration and differentiation of hematogenous GFP-expressing cells into ramified parenchymal microglia within the white and grey matter was found. After four months, up to quarter of regional microglia were bone-marrow derived. Following focal cerebral ischemia, an increased influx of GFP-positive blood-borne cells differentiating into ramified microglia was observed. These results imply a route for the human immunodeficiency virus into the central nervous system, and they offer a noninvasive approach for the transfer of genetically manipulated cells into the adult brain parenchyma.

Key words:

bone marrow chimera

GFP

focal cerebral ischemia

microglia

mouse

transduction

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	3
ABSTRACT	4
1 EINLEITUNG.....	9
1.1 Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems im Gehirn	9
1.1.1 Mikroglia.....	10
1.1.1.1 Identifizierung von Mikrogliazellen.....	10
1.1.1.2 Rolle der Mikroglia als Immunsystem des ZNS	11
1.1.1.3 Herkunft von Mikrogliazellen.....	12
1.1.2 Perivaskuläre und meningeale Zellen	13
1.2 Das Modell der Knochenmarkchimären.....	14
1.3 Der ischämische Hirnfarkt	15
1.3.1 Pathogenese.....	15
1.3.2 Das Tiermodell der fokalen cerebralen Ischämie.....	16
1.4 GFP als inerter Langzeitzellmarker	17
2 HERLEITUNG EINER AUFGABENSTELLUNG.....	19
3 MATERIAL UND METHODEN.....	20
3.1 Material.....	20
3.2 Generierung GFP-exprimierender Knochenmarkchimären	23
3.2.1 allgemeine Zellkulturbedingungen.....	23
3.2.2 Präparation von Knochenmark.....	23
3.2.3 Prästimulationskultur	24
3.2.4 Kultur der MGirL22Y-produzierenden GP+E86 Zelllinie und Vorbereitung der Kokultur	24
3.2.5 Kokultur von Knochenmark und GP+E86-Zelllinie	25

3.2.6	Bestrahlung der Empfängertiere.....	26
3.2.7	Aufbereitung der Zellen aus der Kokultur und Transplantation	27
3.3	Evaluation von Transduktion und Knochenmarktransplantation.....	27
3.3.1	Methylzellulosekulturen.....	27
3.3.2	Blutentnahme, Durchflusszytometrie und Zellsortierung	28
3.4	Ischämieexperimente	29
3.5	Perfusion, Organfixierung und Schneiden.....	29
3.6	Immunhistochemie, Mikroskopie und Quantifizierung	30
4	ERGEBNISSE	32
4.1	Validierung des Modells	32
4.1.1	Evaluation der Transduktion	32
4.1.2	Evaluation der Knochenmarktransplantation	32
4.1.3	Vergleich der Empfindlichkeit von Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie.....	34
4.1.4	Kontrollexperimente.....	36
4.2	Untersuchung von Hirnen knochenmarktransplanterter Mäuse.....	36
4.2.1	Charakterisierung GFP-exprimierender Zellen im nativen Hirn.....	36
4.3	Semiquantitative Bestimmung der Einwanderung von parenchymalen ramifizierten Mikrogliazellen	39
4.4	Erhöhte Einwanderung von GFP-positiven Mikrogliazellen nach transienter fokaler cerebraler Ischämie.....	41
5	DISKUSSION	43
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	43
5.1.1	Einordnung von ramifizierten Mikroglia in das Monozyten-Makrophagen-System und Vergleich zu anderen Studien	43
5.1.2	Reife Monozyten als wahrscheinliche Vorläuferzellen von Mikrogliazellen.....	44
5.1.3	Verhältnis von ramifizierten Mikrogliazellen zu perivaskulären Zellen	45

5.2	Bedeutung für die Therapie von ZNS-Erkrankungen.....	46
5.3	Bedeutung für die Pathogenese der HIV-Enzephalitis	48
5.4	Unterscheidung hämatogener Zellen von ortsständiger Mikroglia im ZNS	48
5.5	Methodische Gesichtspunkte.....	49
5.5.1	Bestrahlung.....	49
5.5.2	Mögliche toxische Effekte von GFP	50
5.5.3	Vorteile des murinen Stammzellvirus	51
6	AUSBLICK.....	52
7	LITERATUR	53
	ABKÜRZUNGEN	65
	DANKSAGUNG	67
	LEBENS LAUF	68
	PUBLIKATIONS LISTE.....	70
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	71

Meinen lieben Eltern, denen ich alles verdanke

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Evaluation einer neuen Methode zur Unterscheidung von hämatogenen Zellen und ortsständigen Mikrogliazellen im Gehirn. Dazu wurde Knochenmark aus Mäusen mit dem Gen für das grüne fluoreszierende Protein (GFP) transduziert und in bestrahlte Mäuse transplantiert. Die Evaluation dieses Modells erfolgte in drei Schritten: Zunächst wurde die Effizienz und Stabilität der GFP-Expression im peripheren Blut der Empfängertiere charakterisiert. In einem zweiten Schritt wurden die Hirne von nativen Empfängertieren auf die Art und regionale Verteilung von GFP-exprimierenden Zellen untersucht. Schließlich wurde überprüft, wie sich die GFP-exprimierenden Zellen nach Auslösung einer fokalen cerebralen Ischämie verhalten.

1.1 Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems im Gehirn

Im nativen Gehirn werden verschiedene Zellarten dem Monozyten-Makrophagen-System zugeordnet. Nach Lokalisation, Morphologie, Expression von Oberflächenmolekülen und Funktion lassen sich folgende Zellen unterscheiden:

- (1) parenchymale Mikrogliazellen
- (2) perivaskuläre und analoge Zellen in der Umgebung der weichen Hirnhäute und
- (3) Makrophagen im Plexus choroideus und in den Meningen.

Verwirrung entsteht in der Literatur dadurch, dass zuweilen alle diese Zellen als Mikroglia bezeichnet werden. In dieser Arbeit wird die Bezeichnung Mikroglia in einem engeren Sinne nur für die Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems verwendet, die im Hirnparenchym zu finden sind.

Während die Makrophagen im Plexus choroideus bzw. in den Meningen Makrophagen in anderen Geweben entsprechen, werden Mikroglia und perivaskuläre bzw. meningeale Zellen als an die spezielle Situation des Gehirns angepasste Immuneffektorzellen aufgefasst und sollen daher ausführlicher vorgestellt werden.

1.1.1 Mikroglia

1.1.1.1 Identifizierung von Mikrogliazellen

Phagozytierende Zellen im Gehirn waren unter pathologischen Bedingungen schon im 19. Jahrhundert von Gluge als Fettkörnchenzellen und von Nissl als Stäbchenzellen beschrieben worden. Eine sich morphologisch von Neuronen und Astrozyten unterscheidende Zellpopulation im adulten nativen Zentralnervensystem (ZNS) wurde dagegen erstmals 1913 von dem spanischen Neuroanatomen Ramon y Cajal unter der Bezeichnung *el tercer elemento*, „das dritte Element“, zusammengefasst. Rio Hortega differenzierte diese Zellen aufgrund von Morphologie, Funktion und Herkunft in zwei Arten von Zellen, die er als Oligodendroglia und Mikroglia bezeichnete. Seine Vorstellung von Mikrogliazellen fasste er 1932 zu einem Konzept zusammen, welches einerseits in seinen Grundzügen nach wie vor Bestand hat, andererseits seitdem durch eine Vielzahl von Studien ergänzt worden ist. Danach sind Mikrogliazellen durch „einen kleinen Kern, wenig Zytoplasma und mehrere dünne, verzweigte, nicht-anastomosierende Fortsätze“ charakterisiert. Sie „repräsentieren das retikulo-endotheliale System im Gehirn“ und transformieren „unter inflammatorischen und nekrotisierenden Bedingungen zu phagozytierenden Fettkörnchen- und Stäbchenzellen“ (Rio Hortega 1932).

Da zur Darstellung von Mikroglia im adulten ZNS lange nur die sehr unzuverlässige Silbercarbonatfärbung zur Verfügung stand, wurde die Existenz von Mikroglia bis in die achtziger Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts immer wieder bezweifelt. Erst durch die Entwicklung alternativer Färbemethoden konnte ihre Existenz gesichert werden. So färbt das aus dem afrikanischen Strauch *Griffonia simplicifolia* gewonnene Isolectin B4 komplexe Kohlenhydrate (α -D-Galactose) in der Glykokalix von Mikrogliazellen an. Desweiteren können einige ursprünglich gegen verschiedene Oberflächenepitope von Leukozyten generierte monoklonale Antikörper auch zur Identifizierung von Mikrogliazellen im Gehirn verwendet werden. In der Maus lässt sich das für Monozyten und Makrophagen spezifische Antigen F4/80 auf der Oberfläche ramifizierter Mikroglia anfärben (Austyn & Gordon 1981). Ramifizierte Mikrogliazellen exprimieren außerdem den Komplement-Typ3-Rezeptor (CR3; CD11b/18 Komplex; Stoll & Jander 1999). Ein weiteres spezifisches Antigen für Monozyten, Makrophagen und Mikroglia ist das ionisierte Calcium bindende Adaptermolekül 1 (Iba1), das im Gehirn spezifisch in ramifizierten Mikrogliazellen der grauen und weißen Substanz, in perivaskulären

Zellen sowie in Makrophagen in den weichen Hirnhäuten und im Plexus choroideus exprimiert wird (Ito et al. 1998). Allen diesen Markern ist gemein, dass sie auch von hämatogenen Makrophagen exprimiert werden.

Neben ihrer charakteristischen Morphologie unterscheiden sich Mikroglia auch in der Expression ihres Ionenkanalmusters von peripheren Monozyten und Makrophagen (Banati et al. 1991). Es gibt es bis heute keinen Antikörper, der in der Maus spezifisch Mikroglia, nicht aber Makrophagen anderer Gewebe anfärbt.

1.1.1.2 Rolle der Mikroglia als Immunsystem des ZNS

Mikrogliazellen werden heute als die ortsständigen Immuneffektorzellen des ZNS aufgefasst, die das Bindeglied zwischen Hirnparenchym und Immunsystem bilden. Unter den Gliazellen beanspruchen sie einen Anteil von etwa 20 % und sind damit in etwa so zahlreich wie Neurone (Banati et al. 1993). Sie bilden einen Teil der Membrana limitans perivascularis (Lassmann et al. 1991).

Die ramifizierten Mikrogliazellen im nativen Hirn reagieren sehr sensibel auf Änderungen in ihrer Umgebung, schon bevor diese histomorphologisch fassbar sind. Diese Aktivierung erfolgt bei infektiösen, entzündlichen, traumatischen, ischämischen, neoplastischen oder degenerativen Läsionen in einer stereotypen Art und Weise. Die Zellen ziehen ihre Fortsätze ein, wobei sich ihr Zellkörper vergrößert. Parallel dazu proliferieren sie und bewegen sich auf den Ort der Läsion zu. Im Rahmen der Aktivierung exprimieren Mikroglia eine Reihe von Oberflächenmarkern neu oder in verstärkter Weise. Dazu gehören der Komplementrezeptor 3 (CR 3), das interzelluläre Zelladhäsionsmolekül 1 (ICAM-1), Integrine, die Hauptgewebekompatibilitätskomplexe (MHC) I und II und das kostimulatorische Molekül B7, sowie in einigen Spezies auch CD-4 (Raivich et al. 1999). Da diese Moleküle auch auf der Oberfläche von Monozyten und Gewebsmakrophagen zu finden sind, ist es bislang kaum möglich, *aktivierte* Mikrogliazellen von eingewanderten Monozyten licht- oder fluoreszenzmikroskopisch zu unterscheiden (Flaris et al. 1993, Stoll & Jander 1999). Der Untergang von Nervenzellen transformiert aktivierte Mikrogliazellen zu Phagozyten, die Zelltrümmer entfernen (Raivich et al. 1999).

In vitro produzieren Mikroglia eine Vielzahl von potentiell zytotoxischen Substanzen wie z. B. freie Sauerstoffradikale, Stickstoffmonoxid, Proteasen, Arachidonsäurederivate, exzitatorische Aminosäuren, Quinolonsäure und verschiedene Zytokine. Andererseits setzen Mikroglia auch Substanzen frei, die potentiell eine neuroprotektive bzw. gewebserhaltende Rolle

spielen können. Beispiele hierfür sind der transformierende Wachstumsfaktor (TGF)- β 1 und Plasminogen (Kreutzberg 1996). Entsprechend wurde spekuliert, ob Mikrogliazellen nicht, vor allem bei subletalen Zellschäden, auch eine gewebserhaltende Rolle spielen können (Banati & Graeber 1994).

1.1.1.3 Herkunft von Mikrogliazellen

Die ontogenetische Herkunft von Mikrogliazellen war lange Zeit umstritten. Heute wird mehrheitlich die Auffassung vertreten, dass sie mesodermalen Ursprungs sind.

Bereits Rio Hortega (1932) postulierte, dass Mikroglia aus dem mesodermalen Bindegewebe der weichen Hirnhaut stammen und in der späten Embryogenese und in den ersten Tagen nach der Geburt in die graue und weiße Substanz einwandern. Als ergänzende Möglichkeit nannte er die Differenzierung von Mikrogliazellen aus Blutmonozyten, obwohl er dafür keine Daten anführen konnte und diese Vermutung lediglich auf die funktionelle Ähnlichkeit der beiden Zellarten gründete.

In der Tat wandern amöboide Zellen während der Embryogenese aus dem Blut ins Hirn ein und phagozytieren dort spontan degenerierende Nervenzellen und -fasern (Ling & Wong 1993). In den ersten Wochen nach der Geburt nimmt die Zahl dieser amöboiden Zellen stark ab, während die Zahl der ramifizierten Mikrogliazellen stark ansteigt, was einen Übergang von der amöboiden in die ramifizierte Form nahe legt.

Neuere Studien unterstützen eine zweite Hypothese. Alliot et al. (1999) zeigten, dass ein großer Teil der Mikroglia im späten embryonalen und frühen postnatalen Hirn durch Proliferation *in situ* entsteht und dass sich Mikroglia ab dem siebten embryonalen Tag (E7) aus dem Dottersack, einem Ort der embryonalen Hämatopoese, und einen Tag später aus dem Hirnrudiment kultivieren lassen. Durch selektive Anfärbung für Isolectin-B4 konnten mikrogliale Vorläuferzellen zum Zeitpunkt E8 im Dottersack und ab E 8,5 im mesenchymalen paraneuroepithelialen Bindegewebe auch *in situ* nachgewiesen werden (Kaur et al. 2001). Zu diesem Zeitpunkt ist die Hirnanlage noch nicht vaskularisiert, so dass diese Vorläuferzellen nicht aus dem Blut stammen können, sondern auf anderem Wege eingewandert sein müssen.

Damit lassen sich zwei mesenchymale Quellen für Mikrogliazellen angeben: zum einen aus dem Dottersack eingewandernde Vorläuferzellen, zum anderen nach der Vaskularisierung des Gehirns eingewandernde zirkulierenden Monozyten.

1.1.2 Perivaskuläre und meningeale Zellen

Unter den genannten Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems im ZNS wurde den perivaskulären Zellen in der Vergangenheit besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Es handelt sich dabei um langgestreckte Zellen, die parallel zu schmalkalibrigen Gefäßen in den Virchow-Robinschen Räumen, also zwischen dem Endothel und der Membrana glia limitans perivascularis und damit *außerhalb* des Hirnparenchyms, liegen. Sie sind allseitig von einer Basalmembran umgeben. Mindestens ein Teil der meningealen Makrophagen exprimiert die gleichen Oberflächenmarker wie die perivaskulären Zellen und liegt in der Fortsetzung der Virchow-Robin'schen Räume zwischen den Barriere bildenden Zellen der pia mater und der Basalmembran der Membrana glia limitans superficialis, weshalb man sie analog als meningeale Zellen bezeichnen könnte (Streit & Graeber 1993, Raivich et al. 1999). Verwirrung stiftet die uneinheitliche Bezeichnung der perivaskulären Zellen: Sie wurden auch als Perizyten und perivaskuläre Mikroglia bezeichnet. Mittlerweile hat sich die Bezeichnung perivaskuläre Zellen für einen Subtyp der Perizyten mit Makrophageneigenschaften etabliert. Durch die allseitige Begrenzung von einer Basalmembran sind diese klar von perivaskulären Mikroglia (= ramifizierte parenchymale Mikroglia in der Nähe von Gefäßen) zu unterscheiden.

Bezüglich des Grades ihrer Aktivierung wird den perivaskulären Zellen eine Mittelstellung zwischen den aktiven Makrophagen in den Meningen und im Plexus choroideus einerseits und den ruhenden Mikrogliazellen andererseits zugeschrieben (Thomas 1999). Sie nehmen Material aus ihrer Umgebung durch Rezeptor vermittelte Endozytose auf, was eine reinigende Funktion für die extrazelluläre Flüssigkeit in den Virchow-Robin'schen Räumen haben könnte. Daneben werden sie als die prinzipiell Antigen präsentierende Zelle im ZNS angesehen. Unklar ist, ob perivaskuläre Zellen ihr Kompartiment verlassen können, um aufgenommenes Material in periphere Organe des Immunsystems zu transportieren (Bechmann et al. 2001). Andererseits gibt es Hinweise, dass sie nach einer Läsion in das geschädigte Hirnparenchym einwandern und dort zur Population der aktivierten Makrophagen beitragen (Streit et al. 1989).

1.2 Das Modell der Knochenmarkchimären

Zur Untersuchung einer Einwanderung von Leukozyten über die Blut-Hirn-Schranke in das adulte ZNS sind Knochenmarkchimären ein etabliertes Modell. Dabei werden Empfängertiere in der Regel einer myeloablativen Bestrahlung ausgesetzt und kurz darauf mit dem Knochenmark eines Spendertieres rekonstituiert. Spenderzellen und ihre Derivate können dabei aufgrund einer genetischen Markierung eindeutig im Empfängerorganismus identifiziert werden. Als genetische Markierungen sind Unterschiede im MHC-System, transgene Konstrukte und die Transplantation von männlichen Spenderzellen in weibliche Empfängertiere verwendet worden. Gegenüber Markierungen durch Farbstoffe bieten sie den Vorteil, dem Knochenmark(transplantat) entstammende Zellen über einen Zeitraum von mehreren Monaten im Empfängertier verfolgen zu können.

Mit Hilfe von Knochenmarkchimären wurde gezeigt, dass Makrophagen im Plexus choroideus und in den Meningen sowie perivaskuläre Zellen einem kontinuierlichen Austausch aus dem Knochenmark unterliegen. Ramifizierte parenchymale Mikrogliazellen aus dem Knochenmark des Spendertieres wurden dagegen nur äußerst selten gefunden und konnten bisher nicht näher charakterisiert werden (Hickey et al. 1992). Analoge Befunde wurden im Hirnstamm von Patientinnen erhoben, denen Knochenmark eines männlichen Spenders transplantiert worden war (Unger et al. 1993).

Weitere Zellarten des Immunsystems, die nach einer Knochenmarktransplantation (KMT) im Hirn gefunden werden können, sind Mastzellen (Silverman et al. 2000) und T-Zellen. Unspezifisch aktivierte T-Zellen überwinden im Rahmen eines physiologischen Überwachungsprozesses die Blut-Hirn-Schranke (Wekerle et al. 1986, Hickey et al. 1991). Ihr Überleben ist an die Erkennung eines spezifischen Antigens gekoppelt, das ihnen im Rahmen von Entzündungsprozessen durch die perivaskulären Zellen und möglicherweise auch durch ramifizierte Mikroglia und Astrozyten präsentiert wird. Wenn dies im nativen Hirn unterbleibt, gehen die T-Zellen innerhalb von 24 Stunden apoptotisch zu Grunde (Hickey 1999).

In jüngeren Arbeiten konnte mit dem Modell der Knochenmarkchimären zudem gezeigt werden, dass Zellen aus dem Knochenmark im adulten Hirn auch zu Endothelzellen, Astrozyten und Neuronen differenzieren können (Eglitis & Mezey 1997, Brazelton et al. 2000, Mezey et al. 2000, Priller et al. 2001b, Hess et al. 2002).

1.3 Der ischämische Hirnfarkt

1.3.1 Pathogenese

Der ischämische Schlaganfall ist Folge einer vorübergehenden oder dauerhaften Minderung des Blutflusses im Versorgungsgebiet einer der großen Hirnarterien. Die Hauptursache dafür ist zumeist der Verschluß einer Hirnarterie durch einen Embolus oder eine lokale Thrombose. Von besonderem Interesse ist die Kaskade der Schadensereignisse, die zum Absterben von Nervenzellen und der daraus resultierenden Behinderung führt.

Vereinfacht lassen sich dabei drei Stadien unterscheiden, wobei die folgende Auflistung der Ereignisse keinen Anspruch auf Vollzähligkeit erhebt:

Sekunden – Minuten: Der aus der Ischämie resultierende Mangel an Glucose und Sauerstoff führt innerhalb von Sekunden zu einer Störung der oxidativen Phosphorylierung. Die betroffenen Nerven- und Gliazellen können Ionengradienten über ihre Membran nicht mehr aufrechterhalten und depolarisieren. Dadurch kommt es zu einer Freisetzung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat, der Natrium- und Chloridkanäle öffnet. Dem Einstrom dieser Ionen folgt Wasser osmotisch nach. Das Ausmaß des so resultierenden Hirnödems bestimmt in dieser Frühphase die Prognose des Patienten.

Minuten – Stunden: Der im Zusammenhang mit den Ionenverschiebungen auftretende Einstrom von Calciumionen aktiviert eine Reihe von Enzymen, die integrale Zytosol- und Membranbestandteile abbauen, was zur Schädigung der Zell- und Mitochondrienmembran führt. In diesem Zusammenhang kommt es zur vermehrten Bildung von freien Sauerstoffradikalen. Daran ist insbesondere die Stickstoffmonoxidsynthetase (NOS) beteiligt, welche von Endothelzellen, Neuronen und Zellen des Immunsystems exprimiert wird. Dieses Enzym produziert Stickstoffmonoxid (NO), welches mit Superoxidanionen (O_2^-) zu hochreaktivem Stickstoffperoxid (NO_3^-) reagiert und über diesen Weg oder direkt Membranmoleküle oxidiert, Enzyme des Energiestoffwechsels hemmt und Nukleinsäuren schädigt. Andererseits wird endothelial produziertem NO eine neuroprotektive Rolle durch Verbesserung der Mikrozirkulation zugeschrieben (Iadecola 1997).

Stunden – Tage: Der Anstieg freier Sauerstoffradikale induziert über die Synthese von Transkriptionsfaktoren (wie z. B. NF- κ B) die Expression einer Reihe von proinflammatorischen Genen (PAF, TNF α , IL-1 β , etc.) und nachfolgend Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen (z. B. ICAM-1). Diese interagieren mit Komplementrezeptoren auf der Oberfläche von Blutzellen,

welche sich an das Endothel anheften, die Gefäßwand überschreiten und in das Hirnparenchym einwandern. Andere Zytokine (z. B. IL-8 und MCP-1), die ebenfalls im Hirn produziert werden, lenken die Leukozytenwanderung an den Ort des Geschehens. Parallel dazu werden ortsständige Mikrogliazellen aktiviert. Beide Zellpopulationen tragen im Folgenden durch die Ausschüttung von Mediatoren sowie durch Phagozytose zu einer komplexen Entzündungsreaktion bei, für die auch die Interaktion mit aktivierten Astrozyten von Bedeutung ist (Dirnagl et al. 1999).

Die Rolle dieser Entzündungsreaktion für den ischämischen Schaden wird ambivalent beurteilt: Einerseits gibt es eine Vielzahl von Hinweisen, dass sie selber zum Schaden beiträgt. So verringert im Tierversuch sowohl die pharmakologische Induktion einer systemischen Neutropenie als auch die experimentelle Blockade von ICAM-1 und IL-1 den ischämischen Schaden (del Zoppo et al. 2001). Andererseits haben die klassischen entzündungshemmenden Pharmaka, Glukokortikoide und nicht-steroidale Antirheumatika, keine therapeutische Wirkung nach einem Schlaganfall (Feuerstein & Wang 2001). Da sich die Entzündungsreaktion erst Stunden nach dem Auslösen einer Ischämie entwickelt, bietet sich - unabhängig von ihrer Dignität - die Möglichkeit, sie therapeutisch zu beeinflussen.

1.3.2 Das Tiermodell der fokalen cerebralen Ischämie

Das Tiermodell der transienten fokalen cerebralen Ischämie stellt eine relativ „naturgetreue“ Reproduktion des ischämischen Schlaganfalls dar. Es bietet gegenüber Modellen der globalen Ischämie den Vorteil, eine variable Reperfusionphase studieren zu können. Zur Auslösung der Ischämie wird in der Maus ein Faden von der Arteria carotis interna bis nach dem Abgang der Arteria cerebri media vorgeschoben und dort für eine definierte Zeitspanne belassen. Dadurch wird der Blutfluss im Versorgungsgebiet der Arteria cerebri media vorübergehend unterbunden bzw. stark eingeschränkt. Nach einer 60-minütigen Ischämie entwickelt sich im Kern des geschädigten Gewebes eine zentrale Nekrose, die nach außen in die Penumbra und weiter in die Perinfarktzone übergeht. Je nach Dauer der Reperfusion können verschiedene Stadien einer Entzündungsreaktion beobachtet werden: Schon nach kurzer Ischämie kommt es innerhalb von Stunden zu einer Aktivierung von perivaskulären Zellen und parenchymalen Mikrogliazellen, die ihre Fortsätze einziehen, eine amöboide Form annehmen und die oben beschriebenen Immunmoleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren. Diese Aktivierung kennzeichnet vor allem die Penumbra. Sie tritt vorübergehend auch in Arealen auf, in denen Nervenzellen nicht letal geschädigt werden (Lipton 1999). Daher wurde spekuliert, dass die Aktivierung von

Mikrogliazellen auch protektiv auf die umgebenden Neurone wirken könnte (Banati & Graeber 1994).

Ab einer bestimmten Schwelle kommt es zu einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke und der nachfolgenden Einwanderung von Leukozyten in das im ischämischen Kern infarzierte Gewebe, in dem Neurone, Astrozyten und Mikroglia geschädigt sind. Granulozyten wandern dabei als erste in das Gehirn ein, sind jedoch nach sieben Tagen kaum noch im Infarktgebiet nachweisbar. Als zweite Population folgen T-Zellen, deren Zahl nach sieben Tagen ein Maximum erreicht und nach weiteren sieben Tagen wieder deutlich abnimmt. Die zahlenmäßig stärkste Population im Infarktgebiet stellen Monozyten bzw. Makrophagen. Sie erscheinen zusammen mit den T-Zellen, persistieren jedoch für einen längeren Zeitraum. Vier Wochen nach der Ischämie sind Zelltrümmer komplett entfernt. Wie oben angedeutet, sind die nach der Ischämie aktivierten und phagozytierenden Mikroglia morphologisch und immunzytochemisch nicht von eingewanderten Makrophagen zu unterscheiden. Daher sind die Makrophagen im ischämischen Areal nicht alle aus dem Blut eingewandert, sondern rekrutieren sich auch zu einem unbestimmten Anteil aus den aktivierten Mikrogliazellen (Stoll et al. 1998, Kato & Walz 2000).

Zusammengefasst machen Makrophagen nach einiger Verzögerung den zahlenmäßig größten Anteil von inflammatorischen Zellen in einer ischämischen Läsion aus. Sie stammen vermutlich aus zwei Quellen: eingewanderten Monozyten und aktivierten Mikrogliazellen.

1.4 GFP als inerter Langzeitzellmarker

Das grüne fluoreszierende Protein (GFP) stammt aus der Qualle *Aequorea victoria*. Nach seiner Klonierung (Prasher et al. 1992) wurde es in pro- und eukaryontische Zellen eingeschleust (Chalfie et al. 1994). GFP besteht aus 238 Aminosäuren. Die chromophore Eigenschaft kommt durch die Ausbildung eines intramolekularen Imidazolrings der Aminosäurereste Serin bzw. Threonin (an Position 65), Tyrosin (66) und Glycin (67) zustande (Cody et al. 1993). Durch gezielten Austausch der Aminosäuren an Position 64 (Leucin für Phenylalanin) und 65 (Threonin für Serin) sowie eine Übertragen der Codons in die im menschlichen Organismus übliche „Schreibweise“ konnte eine verbesserte Mutante, das sogenannte EGFP, gewonnen werden, welches eine bis zu 35-fach hellere Fluoreszenz exprimiert (Cormack et al. 1996). Es wird ideal bei 488 nm von einem Standard-Argon-Laser angeregt, der in Durchflusszytometrie

und Konfokalmikroskopie als Lichtquelle zum Einsatz kommt. Mit einem Emissionsmaximum bei 507 nm kann es andererseits optimal in Filtereinstellungen für Fluoresceinisothiocyanat (FITC), einem in der Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie standardmäßig verwendeten Farbstoff, detektiert werden. Die Fluoreszenz von GFP benötigt außer Sauerstoff keine Substrate oder Kofaktoren. GFP exprimierende Zellen können daher ohne spezielle Vorbehandlung in lebenden oder toten Zellen bzw. Geweben mittels Durchflusszytometrie oder Konfokal- bzw. konventioneller Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden. Da GFP mit 238 Aminosäuren ein relativ kleines Protein ist, kann es auch in feine Verästelungen von Zellen diffundieren (Brand 1995). Durch diese Eigenschaften hat GFP in der Zell- und Molekularbiologie eine breite Verwendung als Reportergen gefunden (Tsien 1998).

2 Herleitung einer Aufgabenstellung

Die stabile Expression von GFP in retroviral transduzierten und nachfolgend in bestrahlte Empfängermause transplantierten hämatopoetischen Zellen (Persons et al. 1997 und 1998) bietet die Möglichkeit, hämatogene Zellen im Empfängerorganismus über einen langen Zeitraum zu untersuchen. Im Unterschied zu vorherigen Knochenmarkchimärenmodellen lassen sich die aus dem Transplantat stammenden Zellen dabei ohne weitere technische Aufarbeitung (Färbung, in-situ-Hybridisierung) aufspüren. Im Gehirn können somit eingewanderte Blutzellen des Monozyten-Makrophagen-Systems von ortsständigen Mikrogliazellen unterschieden werden, wodurch die eingangs beschriebenen Schwierigkeiten in der immunzytochemischen Differenzierung dieser beiden Zellarten in Läsionen umgangen werden.

Im Zusammenhang mit der grundlegenden Charakterisierung eines solchen Modells bot es sich zunächst an, die von anderen Gruppen beschriebene Einwanderung und Differenzierung hämatogener Zellen zu Makrophagen (Lawson et al. 1992, Eglitis & Mezey 1997) im adulten ZNS zu bestätigen und den räumlichen und zeitlichen Verlauf dieser Einwanderung zu untersuchen. In einem zweiten Schritt sollte das Verhalten der genetisch modifizierten Blutzellen nach transienter fokaler zerebraler Ischämie studiert werden und so die prinzipielle Eignung des Modells für die Unterscheidung der beiden Zellarten überprüft werden.

3 Material und Methoden

3.1 *Material*

Produkt	Herkunft
Zellkultur	
MGirL22Y-produzierende GP+E86-Zelllinie	Dr. Derek A. Persons, Memphis, Tennessee, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Biochrom, Berlin
Glucose	Sigma, Deisenhofen
Penicillin	Biochrom, Berlin
Streptomycin	Biochrom, Berlin
Glutamin	Biochrom, Berlin
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Gibco/Life Technologies, Paisley, Schottland
physiologische Kochsalzlösung (NaCl)	Berlin-Chemie, Berlin
rekombinantes murines Interleukin-3 (rMuIL-3)	Promocell, Heidelberg
rekombinantes humanes Interleukin-6 (rHuIL-6)	Promocell, Heidelberg
Stammzellfaktor aus der Ratte (rSCF)	Amgen, Thousand Oaks, Kalifornien, USA
Methylzellulose	Stem Cell Technologies, Vancouver, Kanada
Polybrene	Sigma, Deisenhofen
Gelatine	Sigma, Deisenhofen
5-Fluorouracil	Sigma, Deisenhofen
Kulturflaschen und -platten, Petrischalen	Becton Dickinson, Heidelberg

Transplantation und Ischämie

Heparin	Sigma, Deisenhofen
Cotrimoxazol	Ratiopharm, Ulm
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt
Halothan	Willy Rüscher, Böblingen
Monofilamente „Xantopren M Mucosa“	Heraeus Kulzer, Hanau
Aktivator NF „Optosil Xantopren“	Heraeus Kulzer, Hanau
Blutflussmonitor „Peri Flux 4001 Master“	Perimed, Järfälla, Schweden
Sonde „MTB 5000-0 L240“	
Perfusionsmaschine „Ecoline V-280“	Ismatec, Glattburg, Schweiz

Histologie

Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Sucrose	Sigma, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Schüttler	Heidolph, Schwabach
Eindeckelmedium	Lipshaw, Pittsburgh, Pennsylvania, USA
Objektträger „Superfrost Plus“	Menzel Gläser, Braunschweig
Anti-F4/80	Serotec, Oxford, Großbritannien
Anti-Iba1	Dr. Yoshinori Imai, Tokio, Japan
Ziegenerum	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA
Triton X	DAKO, Hamburg
Biotinylierte Sekundärantikörper	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA
Texas Red-gekoppeltes Streptavidin	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA
konventionelles Fluoreszenzmikroskop „DMRA“	Leica, Bensheim
Inverses Fluoreszenzmikroskop „DMIL“	Leica, Bensheim

Filterblöcke „MS 2 und 4“	Chroma, Brattleboro, Vermont, USA
Digitalkamera „DC 200“, Software Version 2.51	Leica, Bensheim
Konfokales Laserscanmikroskop „MRC 600“	BioRad, Hemel Hempstead, England
Bildverarbeitungssoftware „Photoshop 5.0“	Adobe Systems, Unterschleissheim

Durchflusszytometrie

Durchflusszytometer „FACSCalibur“ mit Software „Cellquest“	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellsortierer „FACSVantage“	Becton Dickinson, Heidelberg
Propidiumiodid (PI)	Pharmingen, Heidelberg
Phycoerythrin-gekoppeltes Anti-Maus-Mac-1	Pharmingen, Heidelberg
Phycoerythrin-gekoppeltes Anti-Maus-CD-4	Pharmingen, Heidelberg
Phycoerythrin-gekoppeltes Anti-Maus-B-220	Pharmingen, Heidelberg
Biotinyliertes Anti-Maus-Gr-1	Pharmingen, Heidelberg
Phycoerythrin-gekoppeltes Streptavidin	Pharmingen, Heidelberg
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Tabellenkalkulationssoftware „Excel 2000“	Microsoft, Unterschleissheim

Lösungen

sofern nicht anders angegeben, erfolgten alle Lösungen in PBS

Puffer

FACS-Puffer	1 mM EDTA in 2 % FCS
Hämolys-Puffer	0,01 M KHCO ₃ + 0,155 M NH ₄ Cl + 0,1 mM EDTA in 2 % FCS
0,1 M Phosphatpuffer	0,08 M Na ₂ HPO ₄ + 0,02 M NaH ₂ PO ₄ in zweifach destilliertem Wasser

3.2 Generierung GFP-exprimierender Knochenmarkchimären

GFP¹-exprimierende Knochenmarkchimären wurden nach dem Protokoll von Persons et al. (1997) in Mäusen hergestellt.

3.2.1 allgemeine Zellkulturbedingungen

Das Zellkulturmedium (ZKM) bestand aus 85 % Dulbecco's Modified Eagle Medium und 15 % hitze-inaktiviertem fötalem Kälberserum. Es enthielt zudem 3,25 g/l D-Glucose, 2 mmol/l Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin. Die Zellen wurden jeweils bei 37 °C in 95 % Luft und 5 % CO₂ bei 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Es wurde phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) ohne Calcium und Magnesium verwendet.

3.2.2 Präparation von Knochenmark

Erwachsene männliche C57/BL6-Mäuse (Mindestalter acht Wochen, Mindestgewicht 18 g) erhielten zur Stimulation des Zellzyklus eine intraperitoneale Injektion von 5-Fluorouracil (150 mg/kg Körpergewicht gelöst in 100 µl 0,9 % NaCl pro mg Substanz). 48 Stunden später wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Injektion von Chloralhydrat (250 µl einer 10%igen Lösung) tief narkotisiert und durch craniocervicale Dislokation getötet. Nach Abtrennung der Hinterbeine wurden die Femores und Tibiae von der umgebenden Muskulatur freipräpariert. Die Knochen wurden mit einer 21 G (Femores) bzw. 23 G (Tibiae) – Nadel an den Epiphysen aufgebohrt und unter sterilen Bedingungen mit eiskaltem 2 % FCS unter Verwendung einer 2 ml – Spritze mehrmals durchgespült, bis die Spülflüssigkeit makroskopisch klar und die Markhöhle makroskopisch frei von Blut war. Das auf diese Weise gewonnene Knochenmark von zwei Tieren wurde im Folgenden gemeinsam weiter verarbeitet.

¹ Streng genommen wurden unsere Knochenmarkzellen mit dem Gen für die verstärkte Variante des GFP (EGFP) transfiziert. Da es in der Literatur allgemein üblich ist, nicht die spezielle Variante des verwendeten GFP anzugeben, wird auch in dieser Arbeit im Folgenden von GFP die Rede sein, obwohl eigentlich EGFP korrekt wäre.

3.2.3 Prästimulationskultur

Das Knochenmark wurde aus der Spüllösung und aus dem ersten Überstand bei 1000 Umdrehungen/Minute über zwölf Minuten abzentrifugiert und in 1 ml ZKM resuspendiert. Der Suspension wurden 20 µl entnommen, die Zahl der kernhaltigen Zellen in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt und daraus die Gesamtzahl der kernhaltigen Zellen im geernteten Knochenmark ermittelt. Die Knochenmarkzellen wurden in einer Konzentration von 2×10^6 kernhaltigen Zellen pro ml ZKM in 75 cm²-Kulturflaschen mit 20 ng/ml rMuIL-3, 50 ng/ml rHuIL-6 und 50 ng/ml rSCF für 48 Stunden kultiviert. Dabei enthielt jede Kulturflasche mindestens 20×10^6 kernhaltige Zellen.

3.2.4 Kultur der MGirL22Y-produzierenden GP+E86 Zelllinie und Vorbereitung der Kokultur

Die ecotrope MGirL22Y-produzierende Zelllinie wurde uns freundlicherweise von Dr. Derek Persons zur Verfügung gestellt.

Persons stellte sie her, indem er den Vektor MGirL22Y in die Verpackungszelllinie GP+E86 transfizierte. GP+E86 ist eine immortalisierte Fibroblastenzelllinie, die die für eine retrovirale Transduktion notwendigen viralen Helfergene *gag*, *pol* und *env* auf zwei verschiedenen Plasmiden enthält. Die Produktion von intakten Retroviren durch diese Zelllinie ist extrem unwahrscheinlich, da dazu drei unabhängige Rekombinationsereignisse notwendig wären. Deshalb gilt GP+E86 als „sichere“ Verpackungszelllinie (Markowitz et al. 1988).

Der Vektor MGirL22Y besteht aus dem murinen Stammzellvirus, in welches die cDNA für EGFP, die interne ribosomale Eingangsseite des Enzephalomyokarditisvirus und eine Mutante (L22Y) des Dihydrofolatreduktasegens integriert wurde (Abbildung 1a).

In unserer Stammkultur wurden die Zellen in 75 cm² – Flaschen kultiviert. Die Zellen wurden alle drei bis vier Tage umgesetzt, wenn sie auf dem Boden der Kulturflasche eine dichte konfluierende Einzelschicht bildeten (Abbildung 1b). Eine Kulturflasche enthielt zu diesem Zeitpunkt etwa 35×10^6 Zellen.

Jeweils 24 Stunden vor der geplanten Kokulturanlage wurden die Zellen umgesetzt, gezählt und eine dem erwarteten Verlauf der Prästimulationskultur entsprechend benötigte Teilmenge mit einer Dosis von 13 Gy (⁶⁰Cobaltkanone, Energiemaxima 1,17 MeV und 1,33 MeV, Dosisleistung circa 1,1 Gy/min, Focus-Isozentrum-Abstand 80 cm) bestrahlt, um den Zellzyklus

zu arretieren. Dadurch wird einerseits ein Überwuchern der Kokultur verhindert und andererseits die Produktion der Viruspartikel durch in der S-Phase arretierte Zellen maximiert.

75 cm² Kulturflaschen wurden für zehn Minuten mit 10 ml einer 0,1%igen Gelatinelösung inkubiert, anschließend wurde die Gelatinelösung vorsichtig abpipettiert. Bei diesem Verfahren bleibt ein dünner Gelatinefilm am Boden der Kulturflasche zurück. Die bestrahlten Zellen wurden anschließend in einer Dosis von $3,5 \times 10^6$ Zellen in 9 ml ZKM pro Kulturflasche ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Der Gelatinefilm sorgte dafür, dass die einzelnen Zellen eine größere Fläche auf dem Boden der Kulturflasche einnahmen. Die Zelloberfläche nahm damit gegenüber der herkömmlichen Kultur um ein Mehrfaches zu, und die ausgesäten Zellen bildeten eine konfluente Einzelschicht. Wenn die Gelatinebeschichtung unterlassen wurde, war dies nicht der Fall.

3.2.5 Kokultur von Knochenmark und GP+E86-Zelllinie

Die Knochenmarkzellen wurden aus dem Kulturmedium der Prästimulationskultur wie oben beschrieben abzentrifugiert. Die nach der Prästimulationskultur am Boden der Kulturflasche adhären Zellen wurden für fünf Minuten in PBS gebadet, mit einem Schaber vorsichtig abgelöst und zusammen mit dem Überstand aus der Prästimulationskultur erneut abzentrifugiert. Anschließend wurde wiederum die Zahl der kernhaltigen Zellen ermittelt. Jeweils eine der am Tage zuvor ausgesäten GP+E86-Kulturen wurde mit einer Knochenmarkdosis von etwa 10×10^6 kernhaltigen Zellen in einem Volumen von 1 ml ZKM beimpft. Diese Kokultur wurde mit 20 ng/ml rMuIL-3, 50 ng/ml rHuIL-6, 50 ng/ml rSCF und 6 µg/ml Polybrene versetzt und für weitere 48 Stunden wie oben inkubiert (Abbildung 1c).

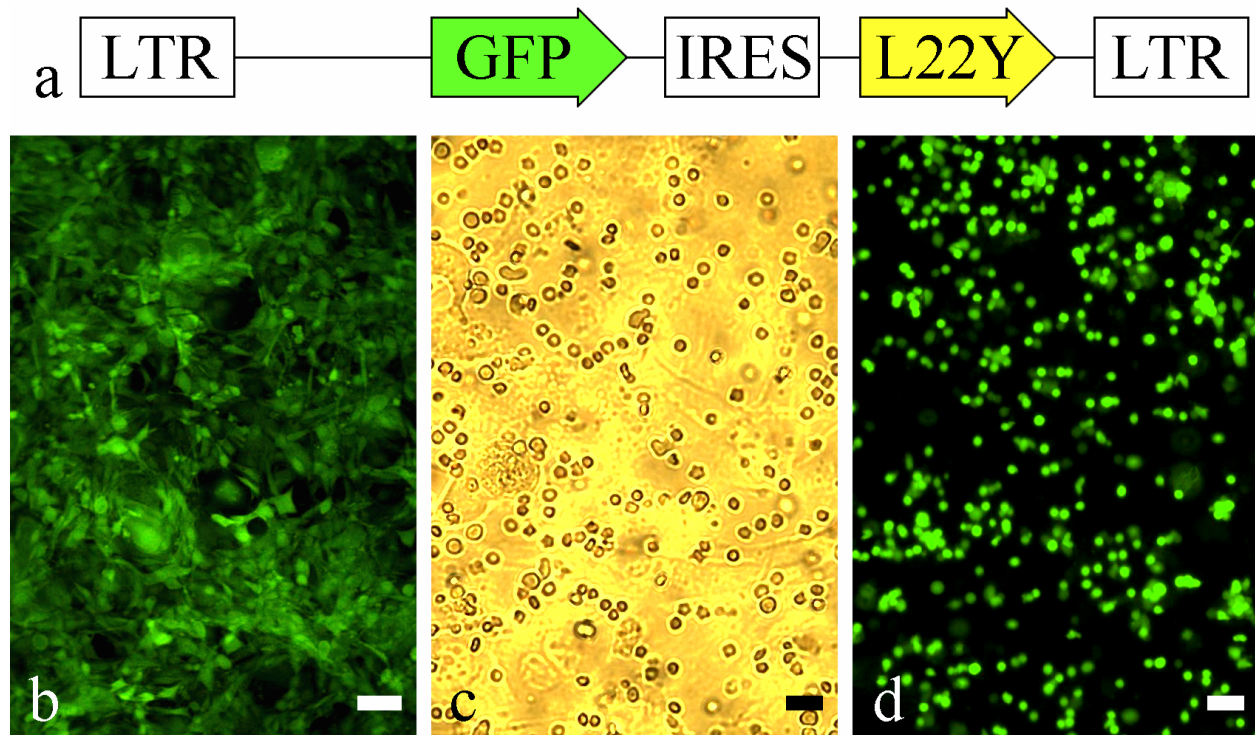


Abbildung 1: Transduktion von Knochenmark: (a) Schema des Vektors MGirL22Y. (b) MGirL22Y produzierende GP+E86-Zellen in Kultur. (c) Kokultur von prästimulierten Knochenmarkzellen als Suspension auf bestrahlten MGirL22Y produzierende GP+E86-Zellen. (d) Transduzierte Knochenmarkzellen acht Tage nach Ausplattieren auf Methylzellulose. (b, d) inverse Fluoreszenzmikroskopie, (c) inverse Durchlichtmikroskopie, der Maßstab entspricht in (b) 100 μm , in (c)+(d) 25 μm .

3.2.6 Bestrahlung der Empfängertiere

Pro Kultur wurden ein oder zwei Mäuse einer fraktionierten γ -Ganzkörperbestrahlung von $2 \times 5,5$ Gy im Abstand von drei Stunden ausgesetzt ($^{137}\text{Cäsium}$ kanone, Energiemaximum 0,662 MeV, Dosisleistung ca. 0,06 Gy/sec, Focus-Isozentrum-Abstand: ca. 20 cm; Spangrude 1994). Drei aus technischen Gründen nicht erfolgreich rekonstituierte Kontrolltiere verstarben innerhalb von 14 Tagen. Die Bestrahlung war somit hochgradig myeloablativ.

3.2.7 Aufbereitung der Zellen aus der Kokultur und Transplantation

Das Medium mit den suspendierten Zellen wurde der Kokultur entnommen, anschließend wurde der MGirL22Y produzierende GP+E86-Zellrasen nach zehnminütiger Inkubation mit 2 % FCS mit dieser Lösung gespült, um auch leicht adhärente Zellen weiterprozessieren zu können. Die Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen und die Zahl der kernhaltigen Zellen wie oben beschrieben ermittelt. Jeweils $2 - 5 \times 10^6$ kernhaltige Zellen wurden in einem Injektionsvolumen von 500 µl 2 % FCS, versetzt mit 25 internationalen Einheiten Heparin, langsam in die Schwanzvene einer Maus injiziert. Die Mäuse wurden zuvor für 15 Minuten mit einer handelsüblichen Infrarotlampe bestrahlt. Im Rahmen der Wärmeregulation der Tiere weitet sich dabei die Schwanzvene, was die Injektion erleichtert. Nach der Transplantation wurden die Tiere einzeln mit jeweils autoklavierter Einstreu, Futter und Wasser, welches mit 670 mg/l Cotrimoxazol versetzt war, in individuell ventilierten Käfigen gehalten, um das Infektionsrisiko zu minimieren.

Die Tierschutzbestimmungen des Landes Berlin wurden eingehalten.

3.3 *Evaluation von Transduktion und Knochenmarktransplantation*

3.3.1 Methylzellulosekulturen

Direkt vor der Injektion wurden etwa 25.000 kernhaltige Zellen abgezweigt, auf 2 ml Methylzellulose in einer kleinen Petrischale ausplattiert und kultiviert. Die resultierenden koloniebildenden Einheiten wurden nach acht bis zehn Tagen mit Hilfe eines inversen Fluoreszenzmikroskops auf ihre GFP-Expression hin untersucht und ausgezählt (Abbildung 1d).

3.3.2 Blutentnahme, Durchflusszytometrie und Zellsortierung

Die durchflusszytometrischen Messungen und die Zellsortierung wurden am Deutschen Rheumaforschungszentrum in Zusammenarbeit mit Dr. Bauke A. de Boer durchgeführt.

Zu definierten Zeitpunkten, frühestens vier bis fünf Wochen nach der KMT, wurde den Tieren einige Tropfen Blut aus der Schwanzvene entnommen und jeweils in 500 µl FACS-Puffer verbracht. Die weitere Prozessierung erfolgte bei +4 °C, zentrifugiert wurde jeweils für drei Minuten bei 2000 U/min. Das Blut wurde für 15 Minuten in 1000 µl Hämolysepuffer verbracht, zweimal in jeweils 1 ml FACS-Puffer gewaschen, entsprechend der Anzahl der geplanten Färbungen aufgeteilt und erneut abzentrifugiert. Die Zellsuspension wurde für 15 Minuten mit 20 µl Antikörperlösung (siehe Tabelle 1) inkubiert, erneut in 1 ml FACS-Puffer gewaschen und schließlich in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert. Mit Ausnahme von Anti-Gr-1 waren alle verwendeten Antikörper direkt mit Phycoerythrin (PE) konjugiert. Anti-Gr-1 war biotinyliert, die entsprechenden Proben wurden daher für 15 Minuten mit Streptavidin-gekoppeltem PE (1 : 200) inkubiert, erneut in 1 ml FACS-Puffer gewaschen und in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert. Ungefärbte Proben dienten als Kontrollen. Direkt vor der Messung wurde jede Probe mit 1 µg/ml Propidiumiodid (PI) versetzt. PI kann die Zellmembran von toten Zellen passieren und wird in die DNA interkaliert. Interkaliertes PI fluoresziert wesentlich stärker als lösliches und lässt sich somit als Marker für tote Zellen verwenden.

Von jeder Probe wurden mindestens 20.000 Ereignisse gemessen. Die Auswertung erfolgte mit den Programmen Cellquest und Excel. Für einen Vergleich der Messsysteme Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie wurden Blutzellen nach Hämolyse nach dem Ausmaß ihrer relativen GFP-Fluoreszenz sortiert. Tabelle 2 fasst die Eigenschaften der verwendeten Filter im Durchflusszytometer bzw. Zellsortierer zusammen.

Tabelle 1: Übersicht über die in der Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper. Die Lösung bestand jeweils aus Antikörper in der angegebenen Verdünnung in FACS-Puffer.

Antikörper	Gekoppelt an	Verdünnung
Anti-Mac-1 (= Anti-CD-11b)	PE	1 : 400
Anti-CD-4	PE	1 : 250
Anti-B220 (= Anti-CD-45R)	PE	1 : 250
Anti-Gr-1 (= Ly-6G)	Biotin	1 : 200

Tabelle 2: Eigenschaften der verwendeten Filter im Durchflusszytometer / Zellsortierer

Bezeichnung	Farbstoff	Teiler	Emissionsfilter
FSC	-	-	488 ± 5 nm
SSC	-	95 %/5 %	488 ± 5 nm
FL 1	FITC/GFP	Langpass 640 nm	530 ± 15 nm
FL 2	PE	Langpass 560 nm	585 ± 21 nm
FL 3	PI	-	Langpass 670 nm

3.4 Ischämieexperimente

Die Ischämieoperationen wurden von Dr. Konstantin Prass in unserem Labor nach der Methode von Hara et al. (1996) ausgeführt.

Sechs Tiere wurden fünf Wochen nach der Knochenmarktransplantation und eine Woche nach der Blutentnahme einer fokalen cerebralen Ischämie zugeführt. Dazu wurden die Tiere mit 1,0 % Halothan in einem Gemisch von 70 % N₂O und 30 % O₂ anästhesiert. Nach entsprechender Präparation wurde ein mit Silikon beschichtetes Monofilament (Stärke 8-0) in die linke Arteria carotis interna eingeführt und bis in die Arteria cerebri media vorgeschoben. Der Beginn der Ischämie wurde durch Messung des regionalen zerebralen Blutflusses mit einem Blutflussmonitor dokumentiert. Nach 60 Minuten wurden die Tiere erneut kurz anästhesiert, und das Monofilament wurde entfernt. Während der gesamten Prozedur wurde die Körpertemperatur der Tiere mit einem Heizkissen zwischen 37,0 und 37,5 °C gehalten.

3.5 Perfusion, Organfixierung und Schneiden

Zu definierten Zeitpunkten wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Injektion mit Chloralhydrat (250 µl einer 10%igen Lösung) tief narkotisiert und thorakotomiert, sobald sie nicht mehr auf Schmerzreize reagierten. Die linke Herzkammer wurde punktiert und nach Eröffnung des rechten Herzvorhofs wurden die Tiere zunächst für zwei Minuten mit eiskaltem PBS, danach für weitere 15 Minuten mit eiskaltem 4%igem Paraformaldehyd (PFA, gelöst in

0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4) perfundiert. Die weitere Prozessierung erfolgte bei +4 °C. Die Gehirne und Milzen wurden entfernt und für 24 Stunden in 4 % PFA postfixiert. Für Vibratomschnitte (30 µm) wurden die Organe in 1 % PFA konserviert und die Schnitte bis zum Färben in 0,1 M Phosphatpuffer aufbewahrt. Für Kryostatschnitte (20 µm) wurden die Organe 24 Stunden in PBS gelegt, 24 bis 48 Stunden in 18%iger Sucrose entwässert und schließlich auf einer tiefgekühlten Aluminiumplatte in einer Trockeneisbox gefroren. Die Schnitte wurden bei –20 °C direkt auf vorgekühlte Objektträger aufgenommen, bei –20 °C gelagert und vor dem Färben über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

3.6 Immunhistochemie, Mikroskopie und Quantifizierung

Die *Vibratomschnitte* wurden in der „Schwebetechnik“ in 24-Loch-Platten gefärbt, wobei jeweils zwei oder drei Schnitte in einem Loch prozessiert wurden. Alle Inkubations- und Waschschrte erfolgten dabei auf einem zweidimensionalen Schüttler. Die *Kryostatschnitte* wurden auf Objektträgern gefärbt, wobei auf die Verwendung eines Schüttlers verzichtet wurde.

Die Schnitte wurden dreimal für je zehn Minuten in PBS gewaschen, für 30-45 Minuten mit 5 % Ziegen serum geblockt und anschließend für 18 Stunden mit dem jeweiligen Primärantikörper (siehe Tabelle 3) inkubiert. Die Schnitte wurden erneut dreimal für je zehn Minuten in PBS gewaschen und für zwei Stunden mit einem speziesspezifischen biotinyliertem Sekundärantikörper (siehe Tabelle 4) inkubiert. Nach erneutem zehnmütigen Waschen in PBS erfolgte die Inkubation mit Streptavidin-gekoppeltem Texas Red (Verdünnung 1 : 500 in 2 % Ziegen serum). Die Schnitte wurden in 0,1 M Phosphatpuffer getaucht, auf Objektträger aufgezogen und eingedeckelt.

Als Negativkontrolle wurde der Inkubationsschritt mit dem jeweiligen Primärantikörper ausgelassen. In diesen Schnitten fand sich kein Immunfluoreszenzsignal.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper. Die Lösung bestand jeweils aus Primärantikörper in der angegebenen Verdünnung + 2 % Ziegen serum in Triton X 0,1 %.

Primärantikörper	Herkunftspezies	Verdünnung
Anti-Iba1	Kaninchen	1 : 70
Anti-F4/80	Ratte	1 : 50

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper. Die Lösung bestand jeweils aus Sekundärantikörper in der angegebenen Verdünnung in 2 % Kälberserum.

Sekundärantikörper	Herkunftspezies	Verdünnung
Anti-Kaninchen	Ziege	1 : 200
Anti-Ratte	Ziege	1 : 400

Die Schnitte wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht, Tabelle 5 nennt die Eigenschaften der verwendeten Filter. Bilder wurden mit einer Digitalkamera aufgenommen und nachgearbeitet. Ausgewählte Schnitte wurden mit einem konfokalen Mikroskop analysiert.

Für die semiquantitative Auswertung wurden die GFP-exprimierenden unter allen Iba1 oder F4/80 positiven ramifizierten Mikrogliazellen in zufällig ausgewählten Schnitten gezählt. Pro Tier und pro Region wurden mindestens zwei Schnitte ausgewertet.

Tabelle 5: Eigenschaften der verwendeten Filterblöcke im Fluoreszenzmikroskop

Bezeichnung	Farbstoff	Anregungsfilter	Teiler	Emissionsfilter
MS 2	GFP	470 ± 20 nm	Langpass 497 nm	522 ± 20 nm
MS 4	Texas Red	581 ± 5 nm	Langpass 593 nm	617 ± 10 nm

4 Ergebnisse

4.1 Validierung des Modells

4.1.1 Evaluation der Transduktion

Acht bis zehn Tage nach Ende der Kokultur konnte das helle GFP-Signal durchgehend in mindestens 80 % der koloniebildenden Einheiten in Methylzellulosekulturen identifiziert werden, was die erfolgreiche Transduktion belegt (Abbildung 1d).

4.1.2 Evaluation der Knochenmarktransplantation

Um die Effizienz der KMT zu beurteilen, wurde bei allen transplantierten Mäusen vier bis fünf Wochen nach der KMT durchflusszytometrisch der Anteil GFP-exprimierender Monozyten (definiert durch Expression von Mac-1) im peripheren Blut analysiert. Zu diesem Zeitpunkt ist die Repopulation durch das transplantierte Knochenmark weitestgehend abgeschlossen (Spangrude 1994). In einigen zufällig ausgewählten Tieren wurde auch der Anteil GFP-exprimierender Granulozyten und B- und T-Lymphozyten bestimmt (definiert durch Expression von Gr-1, B-220 bzw. CD-4). An einigen Tieren wurde diese Bestimmung nach 19 Wochen wiederholt.

Vier Wochen nach KMT exprimierte ein hoher Anteil in allen Zelllinien GFP. Die GFP-Expression war über den untersuchten Zeitraum von vier Monaten stabil, so dass kein signifikantes Abschalten der GFP-Genexpression in den transplantierten Tieren auftrat (Abbildung 2a). In den Milzen von transplantierten Tieren fanden sich schon bei Übersichtsvergrößerung viele GFP-exprimierende Zellen, was die starke Expression des Fluorophors unterstreicht und zudem eine normale Repopulation der peripheren Lymphorgane nach der KMT nahelegt (Abbildung 2b). Klinisch ergaben sich in den transplantierten Tieren keine Hinweise auf Graft-versus-host-disease.

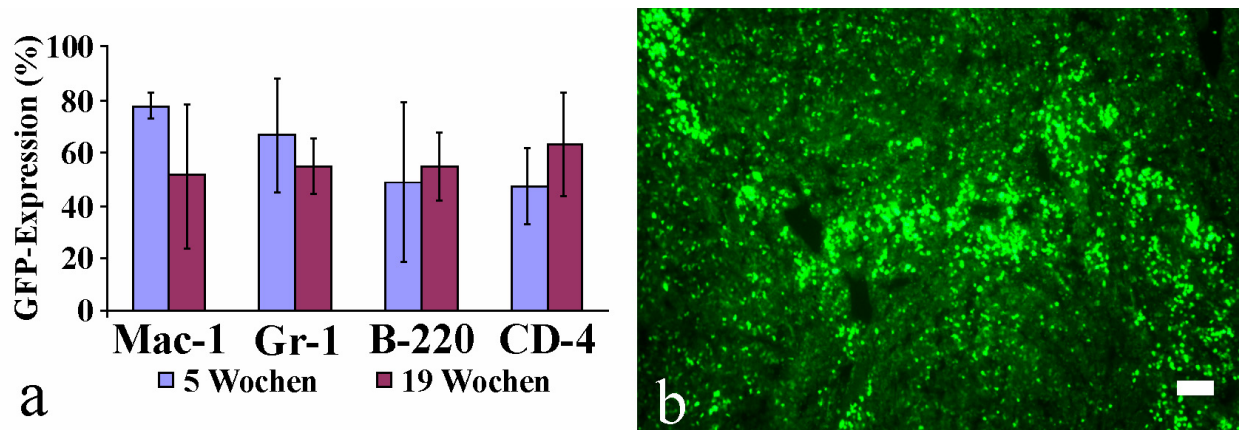


Abbildung 2: Evaluation der Transplantationseffizienz. (a) Durchflusszytometrisch ermittelter Anteil GFP-exprimierender Zellen in einzelnen Zelllinien des Blutes; gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von jeweils vier Tieren. (b) Milz eines transplantierten Tieres 15 Wochen nach KMT. Fluoreszenzmikroskopie, der Maßstab entspricht 50 μm .

Bei der durchflusszytometrischen Messung trat durch die extrem starke GFP-Expression in einzelnen Zellen ein Fehler auf. Die einzelnen Schritte der Analyse sollen daher im Folgenden erläutert werden (Abbildung 3). Bei der Messung von Vorwärts- und Seitwärtsstreuung (FSC bzw. SSC) ließen sich die Leukozyten von den trotz der Hämolyse verbliebenen Erythrozyten und Thrombozyten unterscheiden (Bereich R1 in a). Von den Leukozyten wurden die Propidiumiodid-negativen Zellen (Bereich R2 in b) auf ihre Expression von GFP (c, Kontrollprobe aus nichttransplantierter Maus d) und den jeweiligen Oberflächenmarker analysiert (e). In ungefärbten Kontrollproben fand sich bei Tieren, die mit transduziertem Knochenmark transplantiert worden waren, eine Zellpopulation, deren GFP-Signal so intensiv war, dass es auch im Kanal FL-2, der für die Detektion von PE optimiert war, registriert wurde (f). Diesen Fehler versuchten wir auf zwei verschiedene Weisen zu korrigieren:

In Variante 1 wurde die Kontrollprobe verwendet, in Variante 2 wurde eine virtuelle Kontrollprobe erzeugt, indem die Vertikale in der Quadrantenanalyse so weit nach rechts verschoben wurde, dass nur noch die sehr intensiv GFP-exprimierenden Zellen rechts davon lagen. Der Anteil der GFP-positiven Zellen unter der jeweiligen Zellpopulation wurde aus den Quadrantenstatistiken nach folgender Formel geschätzt:

$$[AP] = \frac{[UR1] - [UR0]}{[UL1] + [UR1] - [UR0]}$$

[AP] = Anteil der GFP-positiven Zellen an den jeweils Differenzierungsmarker-positiven Zellen

[UR1] = Anteil der Zellen im rechten oberen Quadranten in der gefärbten Probe

[UR0] = Anteil der Zellen im rechten oberen Quadranten in der Kontrollprobe

[UL1] = Anteil der Zellen im linken oberen Quadranten in der gefärbten Probe

Variante 1 liefert unter der Voraussetzung, dass Kontrollprobe und gefärbte Probe gleich prozessiert werden, den genaueren Wert. Als Maßstab für dieses Qualitätskriterium kann der Anteil der GFP-positiven Zellen an allen Zellen verwendet werden, der in beiden Proben annähernd gleich groß sein sollte. Dieses Kriterium konnte nicht immer erfüllt werden, was teilweise an den sehr kleinen Blutproben lag. Variante 2 wertet alle Zellen, die in der virtuellen Kontrolle im rechten oberen Quadranten liegen, als falsch-positiv. Damit wird der Wert für [AP] falsch-niedrig, Probe und (virtuelle) Kontrolle beziehen sich dafür jeweils auf dieselbe Probe.

Im Folgenden sind jeweils Werte, die nach der zweiten Variante korrigiert wurden, angegeben. Die mittlere Abweichung zu den ursprünglich gemessenen Werten betrug 7,6 % mit einer Standardabweichung von 5,5 %.

4.1.3 Vergleich der Empfindlichkeit von Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie

Um die Empfindlichkeit der GFP-Detektion mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie zu vergleichen, wurden Zellen aus einer Blutprobe einer mit GFP-transfizierten Knochenmark transplantierten Maus nach dem Ausmaß ihrer GFP-Expression durchflusszytometrisch sortiert. Anschließend wurden die Proben im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Dabei zeigte sich, dass Zellen, die in der Durchflusszytometrie schwach GFP-positiv erkannt werden (in der Abbildung 3e die Zellen im *linken* Drittel der beiden *rechten* Quadranten), im Fluoreszenzmikroskop bei 400-facher Vergrößerung klar von durchflusszytometrisch GFP-negativen Zellen (in der Abbildung 3e die Zellen in den beiden *linken* Quadranten) unterschieden werden können. Somit kann eine vergleichbare Empfindlichkeit der beiden Messsysteme *Durchflusszytometer* und *Fluoreszenzmikroskop/menschlicher Sehapparat* angenommen werden.

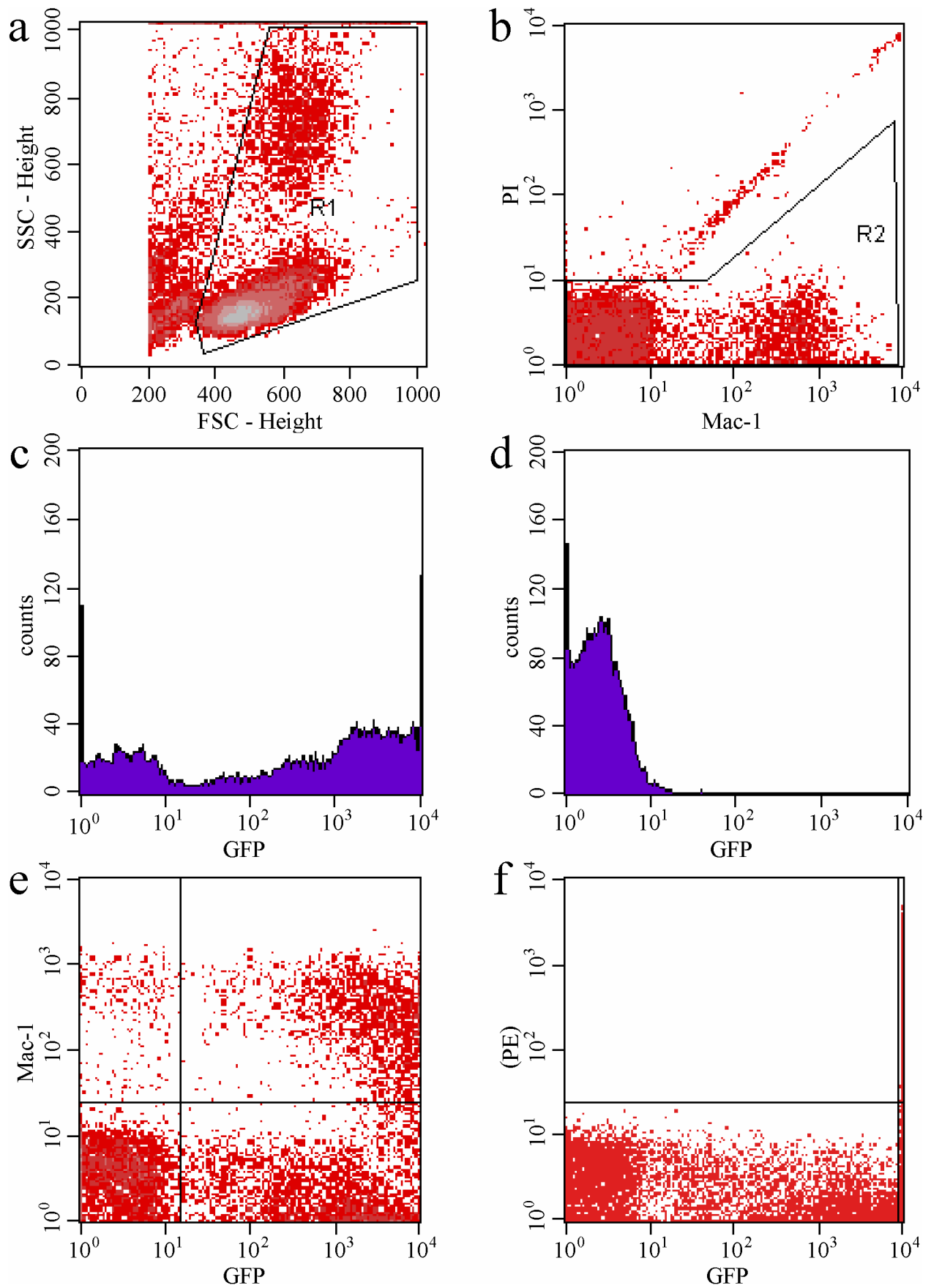


Abbildung 3: Durchflusszytometrische Analysen von peripherem Blut knochenmarktransplanter Mäuse. Dargestellt sind relative Fluoreszenzen. Erläuterung im Text.

4.1.4 Kontrollexperimente

Zur weiteren Evaluation der KMT wurden verschiedene Negativkontrollen durchgeführt: Zwei unbestrahlten Mäusen wurde 500 µl hochtitriger Produzentenzellenüberstand injiziert. Im peripheren Blut dieser Tiere fanden sich nach fünf Wochen und drei Monaten keine GFP-exprimierenden Zellen im peripheren Blut. Außerhalb des oben beschriebenen Kultursystems erfolgte somit keine messbare GFP-Transduktion.

Zwei weitere Mäuse erhielten ohne vorherige Bestrahlung eine Injektion mit GFP-transduziertem Knochenmark. Der Anteil von GFP-exprimierenden Zellen im peripheren Blut dieser Tiere betrug nach fünf Wochen und drei Monaten weniger als 1 %. Die Bestrahlung ist damit in unserem Modell eine notwendige Voraussetzung für ein erfolgreiches Angehen des Knochenmarktransplantats.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass das Modell erfolgreich etabliert werden konnte. Die GFP-Expression in allen Zellreihen des peripheren Blutes war im untersuchten Zeitraum von bis zu vier Monaten hinreichend stabil. Daher konnten wir darauf verzichten, die transduzierten Knochenmarkzellen durch Gabe eines Dihydrofolatreduktasehemmstoffs (z. B. Methotrexat) zu selektionieren.

4.2 Untersuchung von Hirnen knochenmarktransplantierter Mäuse

4.2.1 Charakterisierung GFP-exprimierender Zellen im nativen Hirn

Je drei Tiere wurden zwei, vier, acht und fünfzehn Wochen nach der Rekonstitution geopfert und die Hirne untersucht. Es fanden sich makroskopisch und mikroskopisch keine offensichtlichen neuropathologischen Veränderungen.

In den untersuchten Hirnen ließen sich vier verschiedene GFP-exprimierende Zellpopulationen unterscheiden (Abbildung 4):

→ Vereinzelte runde Zellen, die sich als T-Zellen oder Mastzellen auffassen lassen (Wekerle et al. 1986, Silverman et al. 2000)

- Langgestreckte, unverzweigte Zellen in der unmittelbaren Umgebung von Blutgefäßen (Abbildung 4a) und der weichen Hirnhaut (Abbildung 4b). Bei diesen Zellen handelt es sich wahrscheinlich um perivaskuläre bzw. meningeale Zellen (Bechmann et al. 2001).
- Runde Zellen mit wenigen kurzen Fortsätzen im Plexus choroideus und in der weichen Hirnhaut (Abbildung 4c). Diese Zellen lassen sich als Makrophagen auffassen (Hickey et al. 1992).
- Zellen mit langgestrecktem Soma, mehreren Fortsätzen und feinen, mindestens sekundären Verzweigungen. Diese Zellen fanden sich im Gegensatz zu den anderen Populationen erst vier Wochen nach der KMT in der grauen und weißen Substanz des Hirnparenchyms (Abbildung 4d und 6).

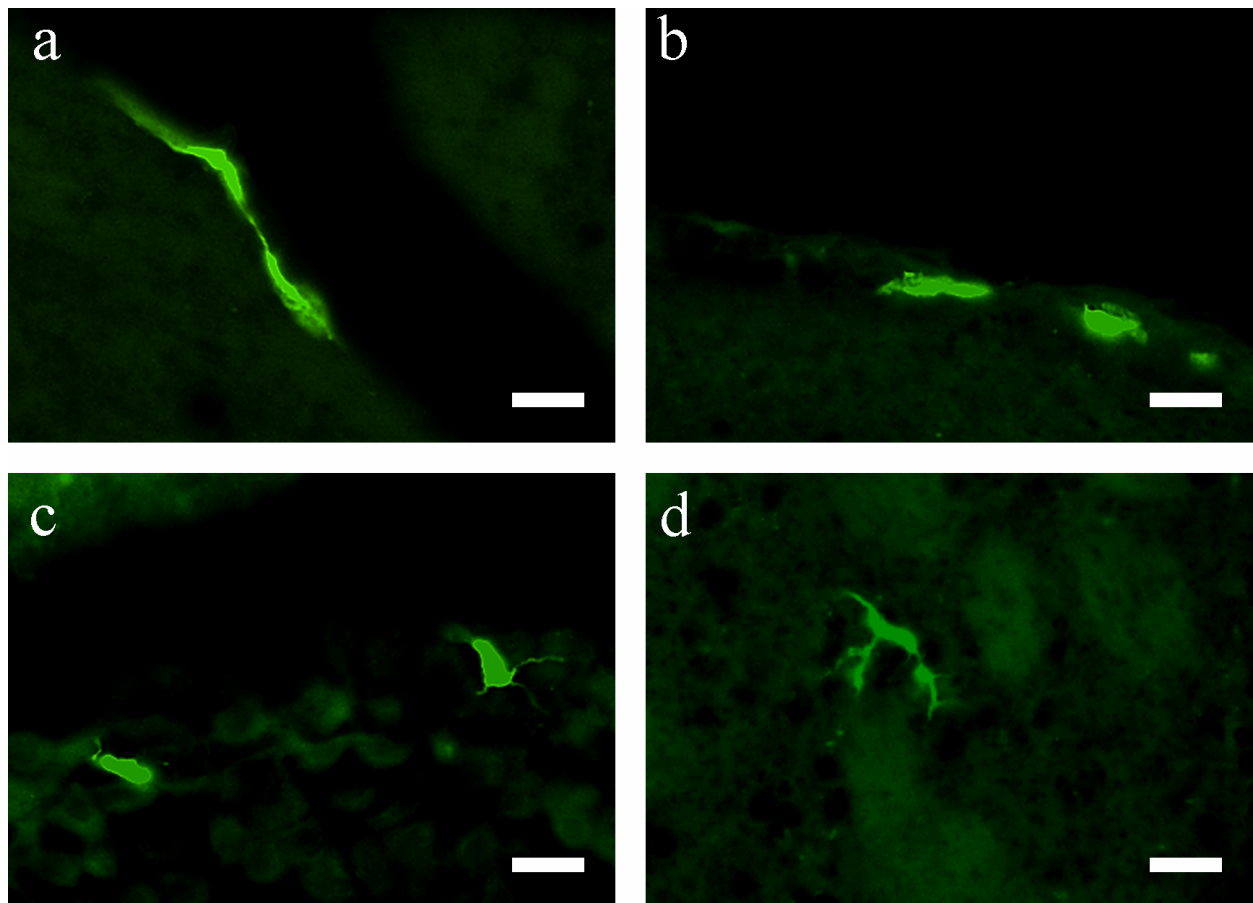


Abbildung 4: Repräsentative Beispiele verschiedener GFP-exprimierender Zellen im Hirn einer Maus 15 Wochen nach Transplantation von GFP-transduziertem KM. (a, b) Langgestreckte Zellen ohne Verzweigungen fanden sich entlang von Blutgefäßen und in den Hirnhäuten. (c) Amöboide Zellen mit wenigen kurzen Fortsätzen erschienen im Plexus choroideus. (d) Mehrfach verzweigte Zellen im Hirnparenchym. (a-d) Fluoreszenzmikroskopie, der Maßstab entspricht jeweils 20 µm.

Die zuletzt genannten Zellen sind in der Literatur bislang nur als singuläre Ereignisse nach KMT beschrieben und wurden deshalb immunhistochemisch näher charakterisiert. Sie ließen sich für die Monozyten- bzw. Makrophagen-spezifischen Antigene F4/80 (Austyn & Gordon 1981) und Iba1 (Imai et al. 1996, Ito et al. 1998) anfärben (Abbildung 5). Die ramifizierte Morphologie in Kombination mit der Expression dieser für Monozyten und Makrophagen spezifischen Antigene spricht dafür, dass es sich bei diesen Zellen um parenchymale Mikrogliazellen handelt.

Der überwiegende Teil der perivaskulären und meningealen Zellen sowie der Makrophagen im Plexus choroideus exprimierte ebenfalls F4/80 und Iba1.

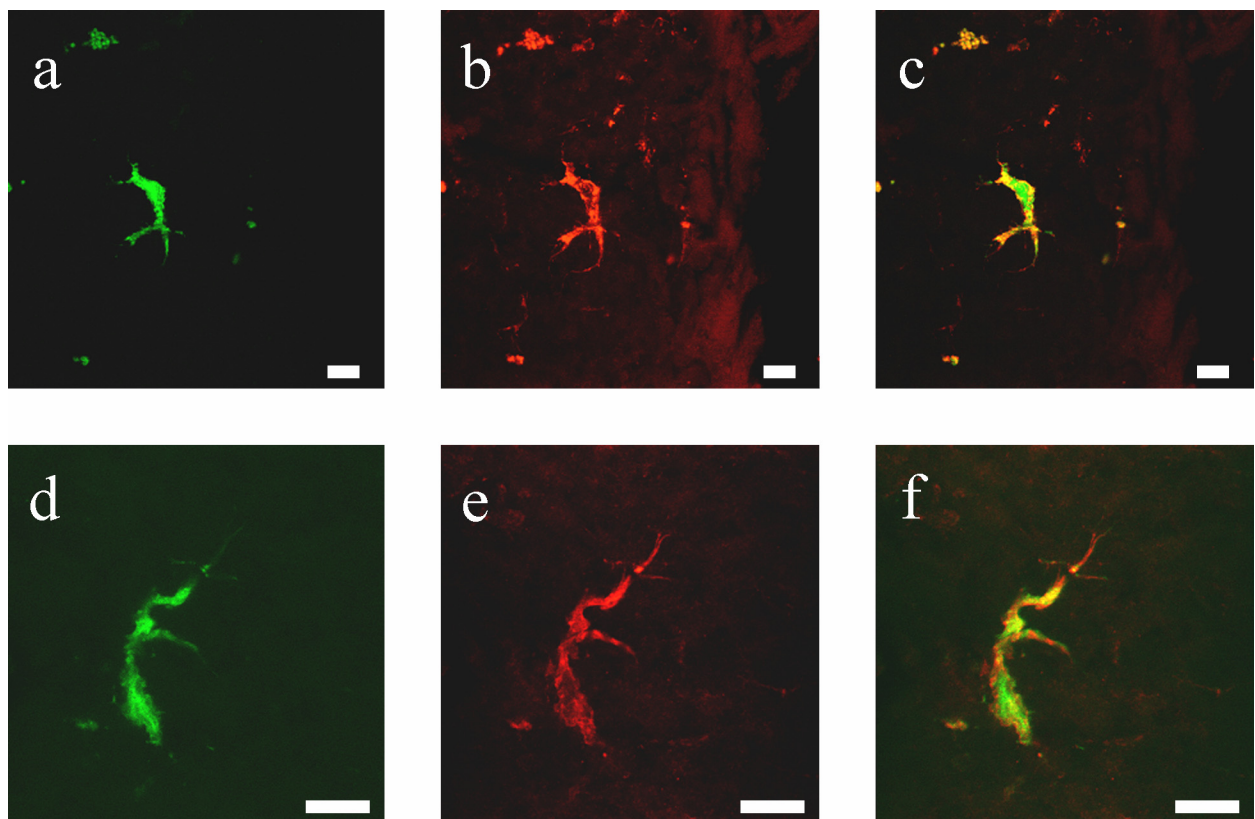


Abbildung 5: Immunzytochemische Charakterisierung von GFP-exprimierenden Zellen im Hirnparenchym. (a, d) GFP-positive ramifizierte Zellen. (b, e) Die Zellen exprimieren F4/80 (b) bzw. Iba1 (e), hier visualisiert mit Texas Red. (c, f) Die Übereinanderlagerung von (a) und (b) bzw. (d) und (e) demonstriert, dass es sich jeweils um dieselbe Zelle handelt. Konfokalmikroskopie, der Maßstab entspricht jeweils 10 μm .

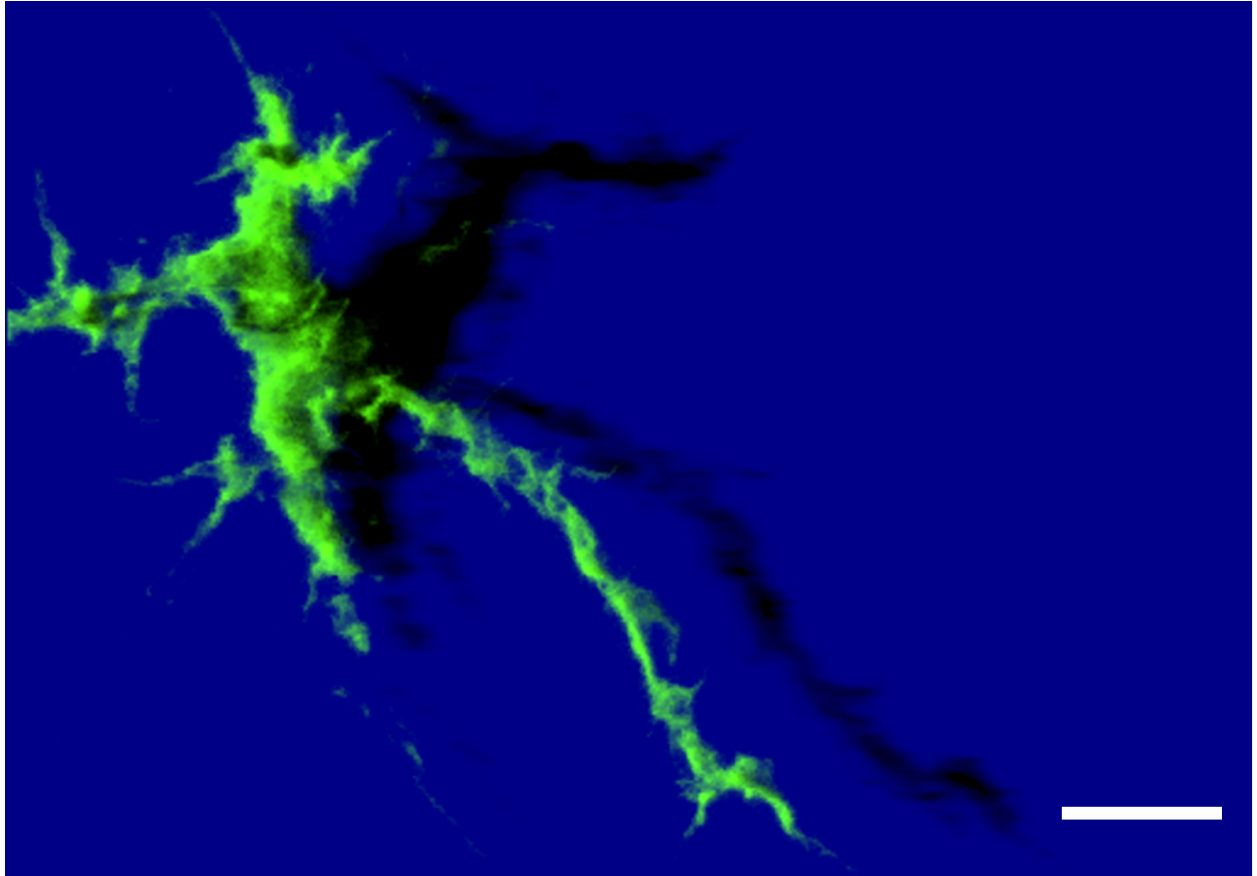


Abbildung 6: Die dreidimensionale Rekonstruktion aus konfokalen Einzelaufnahmen einer GFP-exprimierenden Zelle im Hirnparenchym demonstriert ihre feinen Verästelungen. Der Maßstab entspricht 10 μm .

4.3 Semiquantitative Bestimmung der Einwanderung von parenchymalen ramifizierten Mikrogliazellen

Zur Charakterisierung des räumlichen und zeitlichen Verlaufs der Einwanderung von GFP-exprimierenden ramifizierten Mikrogliazellen wurden je drei Hirne zwei, vier, acht und fünfzehn Wochen nach KMT auf Anzahl und Verteilung von GFP-exprimierenden ramifizierten Mikrogliazellen untersucht. Um in dieser semiquantitativen Analyse als Mikrogliazelle gewertet zu werden, musste eine Zelle drei Kriterien erfüllen:

- i. Sie mußte Ramifizierungen mindestens zweiter Ordnung aufweisen.
- ii. Sie mußte Iba1 exprimieren.
- iii. Sie mußte im Hirnparenchym abseits von Blutgefäßen und Meningen liegen.

Die ersten GFP-positiven Zellen, die diese Kriterien erfüllten, erschienen nach vier Wochen im Bulbus olfactorius. Nach acht Wochen hatte ihre Zahl dort deutlich zugenommen, und auch im Cerebellum fanden sich zu diesem Zeitpunkt GFP-exprimierende Mikrogliazellen. Fünfzehn Wochen nach der KMT, dem letzten in dieser Studie untersuchten Zeitpunkt, fanden sich GFP-exprimierende Mikrogliazellen in allen Hirnregionen (Abbildung 7 und 8). Interessanterweise war ihr Anteil zu diesem Zeitpunkt im Bulbus olfactorius rückläufig. GFP-positive Zelltrümmer in dieser Region suggerierten, dass zumindest einige dieser Zellen apoptotisch untergegangen sein könnten.

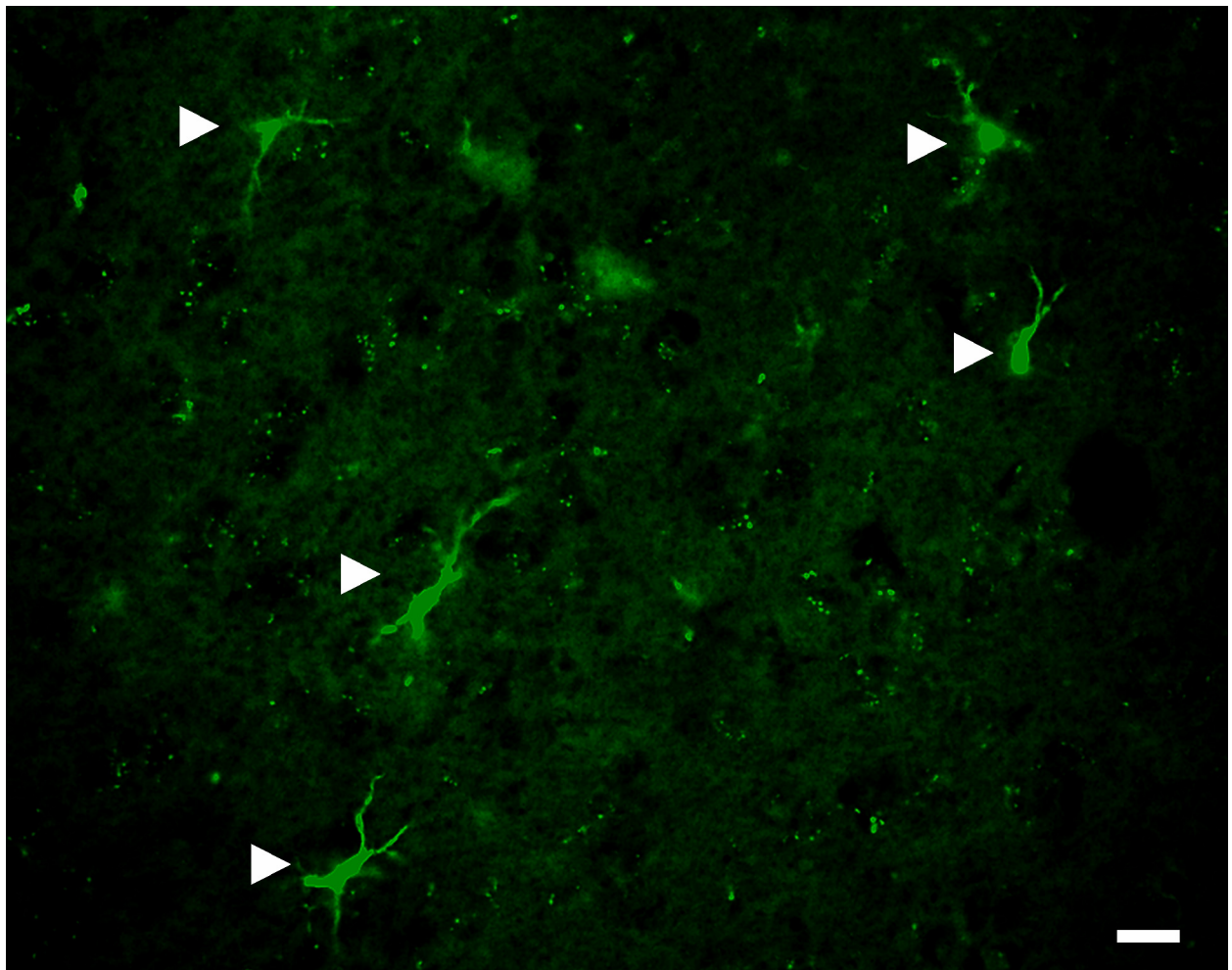


Abbildung 7: Mehrere GFP-exprimierende ramifizierte Mikrogliazellen im Cerebellum fünfzehn Wochen nach KMT. Fluoreszenzmikroskopie, der Maßstab entspricht 20 µm.

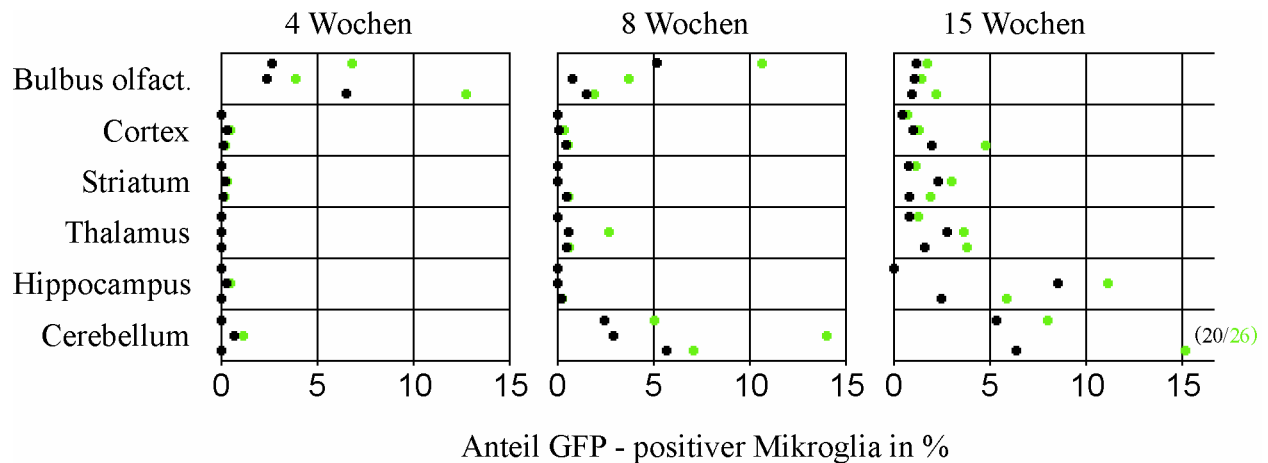


Abbildung 8: Semiquantitative Analyse der regionalen Verteilung von GFP-positiven parenchymalen Mikrogliazellen zu verschiedenen Zeitpunkten. Angegeben ist der Anteil GFP-positiver an allen Iba1-positiven parenchymalen Mikrogliazellen. Jeder schwarze Punkt repräsentiert den Anteil pro Region und individuellem Tier; der entsprechende grüne Punkt den um den Faktor 100 : [Anteil GFP-positiver Mac-1-positiver Zellen im peripheren Blut] extrapolierten Wert. Zwei Wochen nach KMT fanden sich noch keine GFP-exprimierenden Mikrogliazellen im Hirnparenchym. Insgesamt wurden über 45.000 Zellen gezählt.

4.4 Erhöhte Einwanderung von GFP-positiven Mikrogliazellen nach transienter fokaler cerebraler Ischämie

In weiteren Experimenten wurde das Verhalten der dem Knochenmark entstammenden GFP-positiven Zellen im Gehirn unter Schadensbedingungen untersucht. Dazu wurden sechs Tiere fünf Wochen nach der KMT einer 60-minütigen Ischämie der Arteria cerebri media unterzogen und nach 24 Stunden bzw. 14 Tagen geopfert (n jeweils 3). Zum Zeitpunkt der fokalen cerebralen Ischämie ist einerseits die Repopulation des Knochenmarks nach der KMT weitestgehend abgeschlossen, andererseits war das parenchymale Versorgungsgebiet der Arteria cerebri media bis dahin frei von GFP-exprimierenden Zellen (Abbildung 8).

Nach 24 Stunden fand sich im ischämischen Bezirk ein deutliches Infiltrat von runden bzw. amöboiden GFP-markierten Zellen, von denen keine ramifiziert war oder Iba1 exprimierte (Abbildung 9a, c-e). In der kontralateralen Hemisphäre erschienen keine GFP-markierten Zellen (Abbildung 9b). 14 Tage nach der Ischämie differenzierten auf der Seite der Läsion einige GFP-exprimierende Zellen zu Iba1-positiven ramifizierten Mikrogliazellen (Abbildung 9f-h).

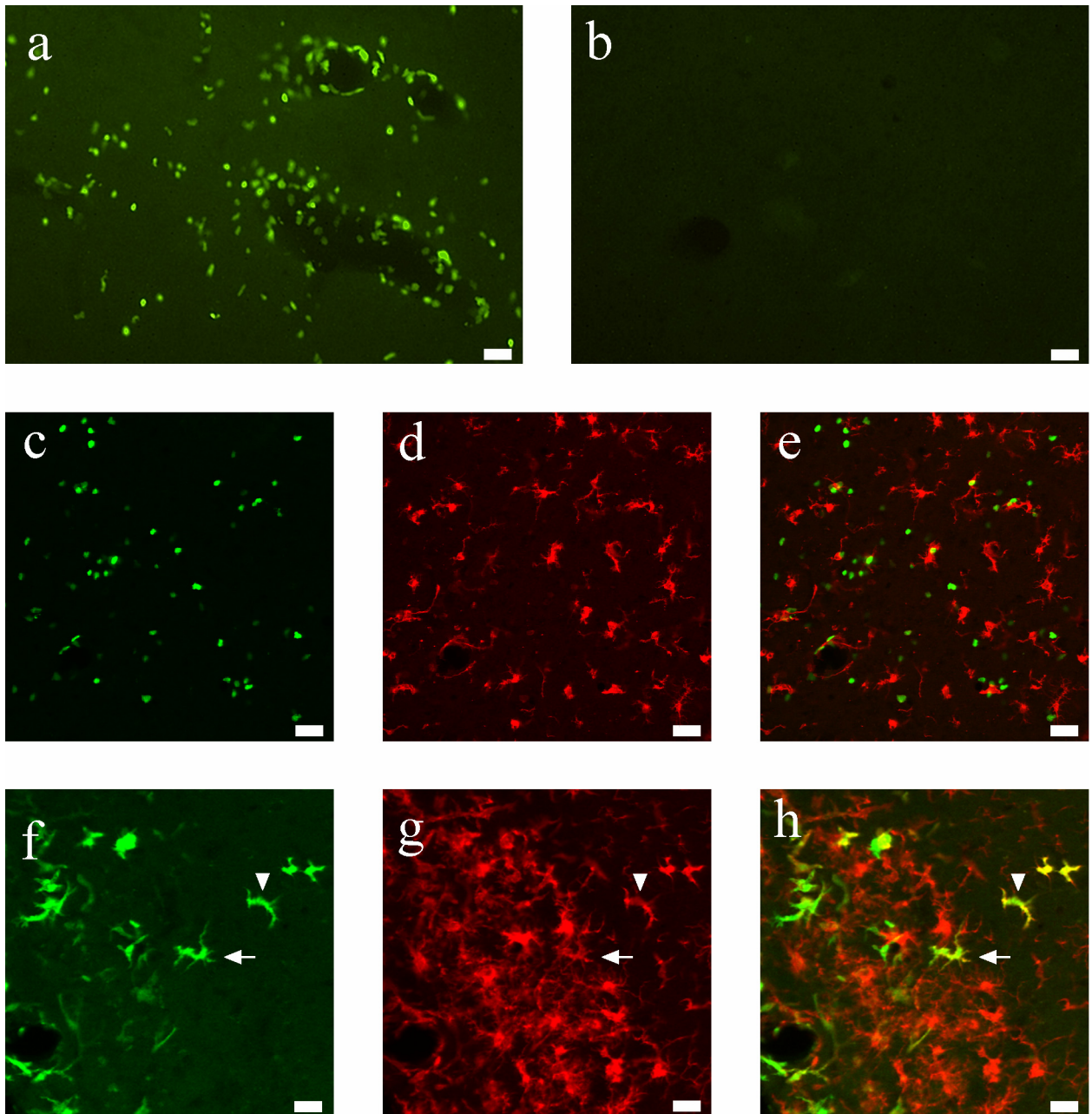


Abbildung 9: Mikrogliale Differenzierung von GFP-exprimierenden hämatogenen Zellen nach fokaler cerebraler Ischämie. (a) 24 Stunden nach Ende der Ischämie markiert ein GFP-positives Infiltrat runder Zellen das geschädigte Areal. (b) In der kontralateralen Hemisphäre finden sich keine GFP-exprimierenden Zellen. (c-h) Immuncytochemische Charakterisierung von Zellen im Infiltrat. (c, f) GFP markiert hämatogene Zellen; (d, g) Iba1 markiert Monozyten und Mikroglia. Nach 24 Stunden exprimiert keine GFP-positive Zelle Iba1 (e, Überlagerung von c und d), was darauf hinweist, dass das Infiltrat zu diesem Zeitpunkt aus nicht-monozytären Zellen besteht. Nach 14 Tagen hingegen sind einige der eingewanderten GFP-positiven Zellen zu Iba1 exprimierenden Mikroglia differenziert (h, Überlagerung von f und g). Der Pfeil markiert eine parenchymale Mikrogliazelle, die Pfeilspitze eine perivaskuläre Zelle. (a, b) Fluoreszenzmikroskopie, (c-h) Konfokalmikroskopie, der Maßstab entspricht in (a)+(b) 20 μm , in (c)-(h) 10 μm .

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals eine signifikante und im zeitlichen Verlauf zunehmende Einwanderung von ramifizierten parenchymalen Mikrogliazellen aus transplantiertem gentechnisch manipuliertem Knochenmark in verschiedene Regionen des nativen adulten Maushirns beschrieben (Priller et al. 2001a). Nach transienter fokaler cerebraler Ischämie wanderten deutlich mehr dieser Zellen in das geschädigte Hirnareal ein.

5.1.1 Einordnung von ramifizierten Mikroglia in das Monozyten-Makrophagen-System und Vergleich zu anderen Studien

Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen vorliegende Untersuchungen, die das Auftreten von Makrophagen im Plexus choroideus sowie von meningealen und perivaskulären Zellen im Hirn aus transplantiertem Knochenmark gezeigt haben. Darüber hinaus beschreiben wir die Einwanderung auch von ramifizierten parenchymalen Mikrogliazellen. Methodische Unterschiede könnten erklären, warum dieser Befund in früheren Arbeiten nicht erhoben wurde: Einige Arbeiten nutzten In-Situ-Hybridisierung zum Auffinden von Donorzellen in Hirnschnitten (de Groot et al. 1992, Unger et al. 1993, Eglitis & Mezey 1997, Miranda et al. 1997). Die hier beschriebenen ramifizierten Zellen haben eine äußerst komplexe Oberflächenmorphologie. Es erscheint vorstellbar, dass diese Mikrostruktur sehr empfindlich gegenüber einer Gewebsprozessierung ist und Schaden nimmt, wenn die Fixierung erst nach dem Schneiden und nicht durch Perfusion erfolgt. So fanden Krall et al. (1994) eine schlechte Darstellung von Mikrogliafortsätzen nach Acetonfixierung von Kryostatschnitten.

Andere Arbeiten verwendeten Diskrepanzen im MHC-I-Epitop zur Identifizierung von Donorzellen im ZNS des Empfängertieres (Matsumoto & Fujiwara 1987, Hickey & Kimura 1987 und 1988, Lassmann et al. 1991, Popovich & Hickey 2001). In den Hirnen dieser Tiere wurden ganz vereinzelt ramifizierte parenchymale Zellen gefunden. Diese traten jedoch so selten auf, dass sie – im Gegensatz zu perivaskulären Zellen aus dem Transplantat – einer elektronenmikroskopischen Untersuchung nicht zugänglich waren (Hickey et al. 1992). Es gibt Hinweise, dass die Gene für den MHC-Komplex im adulten ZNS vermindert exprimiert werden

(Ling et al. 1991). Dies könnte in den angeführten Arbeiten dazu geführt haben, dass vom Knochenmarkspender abstammende und dann sekundär in das Hirn eingewanderte ramifizierte Zellen nicht mehr als solche identifiziert werden konnten.

In zwei Studien wurde β -actin-GFP-transgenes Knochenmark transplantiert. Eine dieser Studien (Ono et al. 1999) weist anhand der hellen Fluoreszenz die Präsenz von GFP im Gehirn nach, macht jedoch keine Aussagen über die entsprechenden Zellen. In der anderen Studie fanden Nakano et al. (2001) im Gehirn GFP-positive Zellen, die auch Iba1 exprimierten. Eine weitere Charakterisierung dieser Zellen hinsichtlich Morphologie oder Lokalisation wurde nicht durchgeführt. Interessanterweise exprimierten einige GFP-positive Zellen auch die spezifischen Markerproteine *gliales fibrilläres astrozytäres Protein* (GFAP) für Astrocyten und *carbonische Anhydrase* (CA-II) für Oligodendrozyten, allerdings nur, wenn Knochenmark direkt in das Gehirn injiziert wurde.

Zusammengefasst kann der Hauptbefund der hier vorliegenden Arbeit durch die Kombination der verwendeten Methoden – Verwendung des sehr sensitiven GFP als Markierung für hämatogene Zellen in Kombination mit Immunhistochemie nach Perfusionsfixierung – erklärt werden.

5.1.2 Reife Monozyten als wahrscheinliche Vorläuferzellen von Mikrogliazellen

Die direkten Vorläuferzellen der hier beschriebenen ramifizierten parenchymalen Mikrogliazellen sind unbekannt. Es gibt Hinweise, dass es sich um reife Monozyten handelt. Monozyten und Makrophagen ramifizieren in Kultur auf Astrozyten (Sievers et al. 1994) oder organotypischen entorhinalen hippocampalen Scheibenkulturen (Hailer et al. 1998) zu Mikroglia-ähnlichen Zellen. Ausserdem exprimieren Monozyten und Makrophagen in Kultur auf Astrozyten ein Mikroglia-ähnliches Muster an Ionenkanälen (Schmidt-mayer et al. 1994). Kennedy und Abkowitz (1998) zeigten, dass bevorzugt ER-MP20-positive Monozyten in Hirn, Leber und Lunge einwandern und im Hirn innerhalb von 7 Tagen vollständig in F4/80-positive Zellen differenzieren. Das Antigen ER-MP20 wird auf reifen Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen exprimiert und ist in die Endotheladhäsion von Leukozyten involviert (de Bruijn et al. 1994). Unsere Ergebnisse lassen sich als Ergänzung zu diesem Befund auffassen, indem sie die Ramifizierung der F4/80 positiven Zellen und deren dauerhafte Präsenz im Hirnparenchym demonstrieren.

Alternativ, wenn auch unwahrscheinlich, könnten die ramifizierten parenchymalen Mikrogliazellen aus zirkulierenden Stammzellen hervorgehen. Einige wenige aus dem Knochenmarktransplantat stammende GFP-exprimierende Zellen im Hirn liessen sich nach morphologischen und immunhistochemischen Kriterien nicht den Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems zuordnen. Da diese Zellen nicht weiter charakterisiert wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um aus dem Blut eingewanderte pluripotente Stammzellen handeln könnte, die in diesem Fall die Fähigkeit zur differentiellen Zellteilung besitzen müssten. In dem von uns verwendeten Modell konnten nach einem Beobachtungszeitraum von 15 Monaten sehr vereinzelt GFP-exprimierende Purkinje-Zellen im Cerebellum beobachtet werden (Priller et al. 2001b), was darauf hinweisen könnte, dass auch zirkulierende Stammzellen die Blut-Hirn-Schranke überwinden und im ZNS zu neuronalen Phänotypen differenzieren können.

5.1.3 Verhältnis von ramifizierten Mikrogliazellen zu perivaskulären Zellen

Die eingewanderten Mikrogliazellen bzw. ihre Vorläufer passieren auf ihrem Weg aus den Gefäßen in das parenchymale ZNS die Virchow-Robinschen Räume. Unklar ist, ob sie dort vorher zu perivaskulären Zellen werden bzw. ob sich die eingewanderten parenchymalen Mikrogliazellen aus dieser Population rekrutieren. Unter Schadensbedingungen (faziale Axotomie bzw. Injektion des Neurotoxins Ricin in den Nucleus facialis) korreliert die Zunahme von MHC-II präsentierenden ramifizierten Mikrogliazellen mit der Abnahme von MHC-II präsentierenden perivaskulären Zellen, was eine Einwanderung ramifizierter Zellen aus dem Pool der perivaskulären Zellen nahelegt (Streit et al. 1989).

In einer Kooperation mit Prof. Dr. Georg W. Kreutzberg (Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried) konnte in unserem Modell 14 Wochen nach KMT gezeigt werden, dass GFP-markierte Mikrogliazellen nach fazialer Axotomie in den Nucleus facialis der Läsionsseite einwandern und die geschädigten Motoneurone umgeben. Bei diesem Schadensmodell bleibt die Blut-Hirn-Schranke intakt, so dass die GFP-markierten Mikrogliazellen entweder aus den bereits vor der Axotomie im Hirnparenchym vorhandenen Zellen stammen oder zirkulierende Monozyten über die intakte Blut-Hirn-Schranke angezogen werden. In beiden Fällen dürfte dieser Prozess über spezifische molekulare Mediatoren ablaufen. Ein möglicher Kandidat hierfür ist das sogenannte „monocyte chemoattractant protein-1“ (MCP-1; Flügel et al. 2001). Andererseits kann dieser Mechanismus nicht die spezielle

räumliche und zeitliche Verteilung der mikroglialen Einwanderung in den nativen Knochenmarkchimären erklären, in denen die Anzahl der GFP-positiven Mikrogliazellen im Bulbus olfactorius abnahm, während sie in den übrigen Hirnregionen zunahm. Daher scheint die „physiologische“ Einwanderung von Mikrogliazellen anderen Faktoren zu unterliegen als die Einwanderung unter pathologischen Bedingungen.

Es gibt Hinweise, dass die perivaskulären Zellen ihr Kompartiment auch in Richtung des Blutstroms verlassen und aufgenommenes Material in Lymphknoten präsentieren. Unklar ist das „Schicksal“ der parenchymalen Mikrogliazellen. Sie könnten im Parenchym persistieren, in die Zirkulation zurückkehren oder apoptotisch untergehen. Die Abnahme ihrer Zahl im Bulbus olfactorius und das vereinzelte Auftreten von GFP-positiven Zelltrümmern spricht für das Vorkommen der letzten Möglichkeit, ohne die anderen auszuschließen.

Fokale cerebrale Ischämie als exemplarisch verwendetes Schadensmodell führte in der vorliegenden Arbeit zu einer vermehrten Einwanderung und Differenzierung hämatogener Mikrogliazellen in das geschädigte Areal. Nach morphologischen Kriterien sind die Mikrogliazellen im geschädigten Areal einer Fraktion zuzuordnen, die nicht (mehr) phagozytotisch aktiv ist, aber noch eine mäßige Aktivierung aufweist und mit Lymphozyten interagieren könnte (Raivich et al. 1999).

Somit wandeln sich nicht nur Mikrogliazellen in aktivierte und phagozytierende Makrophagen um, sondern auch der umgekehrte Weg von Monozyten hin zu ramifizierten Mikrogliazellen ist möglich. Unklar bleibt, ob die eingewanderten Zellen einen neurotoxischen oder neuroprotektiven Effekt ausüben.

5.2 Bedeutung für die Therapie von ZNS-Erkrankungen

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass es durch Knochenmarktransplantation möglich ist, fremde Gene dauerhaft in das Hirnparenchym zu schleusen, und zwar in erhöhtem Maße in pathologisch veränderte Areale. Hämatopoetische Stammzellen oder periphere Blutzellen könnten sich damit als Vehikel zur Einschleusung von therapeutischen Genen eignen.

Einige lysosomale Speichererkrankungen führen im ZNS zu einer Anhäufung von Produkten des Fettsäurestoffwechsels in verschiedenen Zellpopulationen (Poenaru 2001). Die Globoidzellen-Leukodystrophie (GZL, Krabbe-Krankheit) ist ein Beispiel für eine solche Erkrankung. Es handelt sich dabei um ein autosomal-rezessives Erbleiden, das auf einem Mangel

des lysosomalen Enzyms Galactocerebrosidase beruht. Die GZL ist durch einen fortschreitenden Verlust der zentralen und peripheren Myelinscheiden gekennzeichnet, was klinisch zur Spastik, peripheren Neuropathie und Demenz führt. Die Erkrankung manifestiert sich in der Kindheit und führt bei progredientem Verlauf innerhalb weniger Jahre zum Tode. Die Transplantation allogener hämatopoetischer Stammzellen wurde erfolgreich zur Therapie der GZL eingesetzt (Krivit et al. 1998). Darüberhinaus gibt es eine Reihe von experimentellen Studien, in denen eine allogene KMT zu einer klinischen und pathologischen Verbesserung von Läsionen im ZNS bei Leukodystrophien führte (Walkley et al. 1994, Wada et al. 2000, Wu et al. 2001), während eine KMT bei anderen lysosomalen Speichererkrankungen den Krankheitsverlauf nicht aufhalten konnte. Die unterschiedlichen Ergebnisse nach KMT könnten auf Aktivitätsunterschiede der bei der jeweiligen Krankheit betroffenen Enzyme zurückzuführen sein. Unter dieser Vorstellung könnte eine Erhöhung der intrazerebralen Enzymaktivität therapeutische Effekte haben. Dazu bietet es sich an, hämatopoetische Stammzellen mit einem therapeutischen Gen zu versehen und sie den betroffenen Patienten zu reinfundieren. Dieser Ansatz könnte auch den Patienten helfen, für die kein gewebekompatibler Spender zur Verfügung steht.

Mikrogliazellen sind als Effektorzellen von therapeutischen Veränderungen im ZNS nach KMT postuliert worden (Krivit et al. 1995). Diese Vermutung wird durch die hier beschriebene Einwanderung von parenchymalen Mikrogliazellen aus dem transplantierten Knochenmark unterstützt. Die starke Expression des transduzierten GFP in diesen Zellen zeigt zudem, dass es mit diesem Verfahren möglich ist, fremde Gene in das Hirnparenchym einzuschleusen und dort dauerhaft zu exprimieren. Erste Studien berichteten kürzlich über eine Lebensverlängerung und Verzögerung der zentralnervösen Symptomatik in Tiermodellen von lysosomalen Speicherkrankheiten nach Transplantation von Knochenmark, welches retroviral mit den Genen für die fehlenden Enzyme transfiziert worden war (Miranda et al. 2000, Matzner et al. 2002).

KMT und Mikroglia-vermittelter Gentransfer könnte sich auch bei anderen ZNS-Erkrankungen anbieten, zumal die transduzierten Mikrogliazellen bevorzugt in Areale mit pathologischen Veränderungen einwanderten, wie hier am Beispiel der fokalen cerebralen Ischämie demonstriert wurde. Ein solcher Zugang wäre verhältnismäßig wenig invasiv und könnte den Verzicht auf neurochirurgische Eingriffe zum Einbringen therapeutischer Gene ermöglichen (Yenari et al. 2001).

Kürzlich wurden erste erfolgreiche somatische Gentherapieansätze beim Menschen beschrieben. Kinder mit schweren kombinierten Immundefekten wurden durch autologe KMT erfolgreich behandelt, nachdem ihre Knochenmarkstammzellen mit Vektoren, die das fehlende Gen enthielten, transduziert worden waren (Hacein-Bey-Abina et al. 2002, Aiuti et al. 2002).

5.3 Bedeutung für die Pathogenese der HIV-Enzephalitis

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Hypothese, dass Leukozyten als „trojanische Pferde“ für intrazelluläre Mikroorganismen fungieren und diese über die Blut-Hirn-Schranke in das parenchymale Gehirn transportieren können. Obwohl in dieser Arbeit nicht mit vermehrungsfähigen Mikroorganismen, sondern mit einem replikationsdefekten Retrovirus gearbeitet wurde, erlauben die Ergebnisse einige vorsichtige Schlüsse im Hinblick auf die Pathogenese der Humanen Immunodefizienz (HIV)-Enzephalitis.

Unter diesem Begriff werden alle neuropathologischen Veränderungen zusammengefasst, die direkt oder indirekt nur auf die Anwesenheit von HIV im Gehirn zurückzuführen sind, nicht hingegen auf die Effekte opportunistischer Infektionen. Im Gegensatz zu anderen viralen Enzephalitiden treten dabei kaum Lymphozyteninfiltrate auf, und die Gewebeerstörung ist minimal (Glass et al. 2001). Gerade angesichts der Tatsache, dass die überwältigende Mehrheit von HIV-infizierten Zellen im Gehirn Makrophagen bzw. Mikroglia sind, stellt sich die Frage, wie das HI-Virus in das ZNS gelangt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass retroviral transduzierte Blutzellen offenbar auch ohne die Stimulation durch pathologische Prozesse in das native Hirnparenchym einwandern und dort als Mikroglia dauerhaft persistieren können. Analog könnte HIV über infizierte Monozyten, die nach Einwanderung zu Mikroglia differenzieren, dauerhaft in das ZNS gelangen.

5.4 Unterscheidung hämatogener Zellen von ortsständiger Mikroglia im ZNS

Mit der hier verwendeten Methode können hämatogene Zellen eindeutig im ZNS identifiziert werden. GFP-exprimierende Knochenmarkchimären eignen sich somit als Basismethode zur Untersuchung der Entzündungsreaktion nach cerebraler Ischämie und wahrscheinlich auch in anderen Schadensmodellen. Kombinationen mit anderen Methoden, insbesondere transgenen oder knock-out Mäusen, bieten sich an. In unserem Labor läuft gegenwärtig eine Untersuchung zur Rolle der induzierbaren NO-Synthetase (iNOS) bei der fokalen cerebralen Ischämie. Dazu werden die Entwicklung und das Ausmaß der Entzündungsreaktion in GFP-exprimierenden iNOS-knockout-Knochenmarkchimären mit den

entsprechenden Veränderungen in den GFP-Wildtyp-Knochenmarkchimären der hier vorliegenden Studie verglichen.

5.5 Methodische Gesichtspunkte

Einige Aspekte der vorliegenden Studie müssen unter methodischen Gesichtspunkten diskutiert werden.

5.5.1 Bestrahlung

Die Knochenmarkempfänger in dieser Studie waren einer letalen Bestrahlung ausgesetzt. Es ist daher nicht auszuschließen, dass strahlenbedingte Schädigungen der Blut-Hirn-Schranke oder des Gehirns die Ergebnisse beeinflusst haben.

Padovan et al. (1999) beschrieben entzündliche Gefäßveränderungen im Gehirn von Patienten nach allogener KMT. Diese konnten im Mausmodell bei allogenen transplantierten Tieren, nicht jedoch in der syngenen Kontrollgruppe (in der wie in der vorliegenden Studie Knochenmark von C57/BL6 Mäusen verwendet wurde) reproduziert werden (Padovan et al. 2001). Diese Gefäßveränderungen sind somit eher einer Graft-versus-host-disease als einer genuinen Strahlenschädigung zuzuordnen. In einer systematischen Untersuchung von Schäden der Blut-Hirn-Schranke beschrieben Ciccirello et al. (1996) kollabierte Hirnkapillaren, eine perivaskuläre Ödembildung und aktivierte Astrozyten 90 Tage nach der Bestrahlung. Obwohl in dieser Studie die kumulierte Strahlendosis mit 40 Gy fast viermal so hoch war wie in der vorliegenden Arbeit, wurden keine Schäden an den „tight junctions“ zwischen den einzelnen Endothelzellen gefunden.

Andererseits wurde ein leichter Anstieg von Mikrogliazellen im Gehirn auch nach niedrigen Bestrahlungsdosen (2 Gy) beschrieben (Chiang et al. 1993). Diese Beobachtung steht im Einklang mit der gängigen Auffassung, dass Mikrogliazellen äußerst sensibel und unspezifisch auf verschiedene Schadensmechanismen im ZNS reagieren (Kreutzberg 1996). Insofern kann gegen unser Modell der Einwand erhoben werden, dass es per se eine nicht zu vernachlässigende ZNS-Pathologie beinhaltet.

Bestrahlungsdosen in der hier verwendeten Größenordnung werden standardmäßig zur Myeloablation verwendet. Ohne Myeloablation lassen sich nur sehr geringe Rekonstitutionsraten nach KMT im Mausmodell erzielen, die weiter abnehmen, wenn das Knochenmark im Rahmen des Gentransfers *in vitro* mit Zytokinen behandelt wird (Peters et al. 1995).

Andererseits überwinden Monozyten (Lawson et al. 1992), T-Zellen (Wekerle et al. 1986, Hickey et al. 1991) und reife Mastzellen (Silverman et al. 2000) die Blut-Hirn-Schranke auch im unbestrahlten adulten Tier, während Bestrahlung und Injektion von Knochenmarkzellen keinen Einfluss auf den Phänotyp von Leukozyten im Hirn des Empfängertieres zu haben scheinen (Schluter et al. 2001).

Somit sind Effekte durch die Bestrahlung zwar nicht auszuschließen, dürften die Ergebnisse aber allenfalls in geringem Maße beeinflusst haben.

5.5.2 Mögliche toxische Effekte von GFP

Es soll an dieser Stelle nicht verschwiegen werden, dass GFP-assoziierte toxische Effekte sowohl *in vitro* nach Transfektion als auch in transgenen Modellen beschrieben worden sind. So fanden Liu et al (1999) Hinweise, dass mit dem GFP-Gen transfizierte Zellen zur Apoptose neigen. In einer transgenen Mauslinie, die GFP unter dem Promoter des α -Myosin-Schwerketten-Gens exprimiert, entwickelten die Tiere, die besonders stark GFP exprimierten, eine dilatative Kardiomyopathie (Huang et al. 2000). In beiden Fällen ist jedoch unklar, ob der toxische Effekt allein auf die Präsenz des GFP zurückzuführen ist. Freie Radikale, die bei der Exzitation des GFP entstehen, könnten *in vitro* einen phototoxischen Effekt vermitteln. Der in der transgenen Mauslinie beschriebene toxische Effekt könnte auch auf die Präsenz des spezifischen Promoters zurückzuführen sein.

Umgekehrt spricht gerade die Vielzahl und Vielfältigkeit der in der Literatur beschriebenen Anwendungen für GFP gegen einen generellen toxischen Effekt des Fluophors. GFP wurde in verschiedenen Transfektionsmodellen erfolgreich als Reportergen eingesetzt. In transgenen Modellen wurde GFP sowohl unter der Kontrolle von zellspezifischen Promotoren (z. B. für Astrozyten, Oligodendrozyten und Makrophagen) als auch ubiquitär in β -actin-GFP-transgenen Mäusen exprimiert, ohne dass Nebenwirkungen beobachtet wurden (Okabe et al. 1997, Goldman & Roy 2000).

5.5.3 Vorteile des murinen Stammzellvirus

In verschiedenen Modellen (Bierhuizen et al. 1997, Limon et al. 1997, Bagley et al. 1998) wurde Knochenmark retroviral mit dem GFP-Gen transfiziert. Das murine Stammzellvirus (MSCV) erwies sich dazu als besonders geeignet, da es zur stabilen und dauerhaften Expression des Konstrukts in allen Blutzelllinien führt (Persons et al. 1998), was neben der hier vorliegenden Studie auch andere Arbeiten über Zeiträume von sechs bzw. zwölf Monaten bestätigen (Kume et al. 2000, Matzner et al. 2000).

Das MSCV ist weniger anfällig gegenüber dem Abschalten von Genen auf der Transkriptionsebene *in vivo* als andere retrovirale Vektoren (Pawliuk et al. 1997). Dies ist besonders im Gehirn relevant, wo dieses Abschalten häufig auftritt. So wiesen Krall et al. (1994) als erste genetisch modifizierte Makrophagen nach KMT im Maushirn nach. In dieser Studie wurden die hämatopoetischen Zellen mit dem Moloney Mäuse Leukämie Virus (MMLV) transduziert. Während sich mittels semiquantitativer Polymerasekettenreaktion ein zehnfacher Anstieg der Makrophagen drei bis vier Monate nach der KMT ergab, stieg die Anzahl der immunhistochemisch nachgewiesenen Zellen aus dem Transplantat im Gehirn in diesem Zeitraum nur um den Faktor zwei.

6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wird die Einwanderung von parenchymalen Mikrogliazellen aus transplantiertem gentechnisch manipuliertem Knochenmark in verschiedene Regionen des nativen adulten Maushirns beschrieben. Obwohl es sich dabei um ein experimentelles Modell handelt, ergeben sich mehrere Anknüpfungspunkte zur Humanmedizin.

In einem ersten Schritt sollte untersucht werden, ob der hier im Mausmodell erhobene Befund im Autopsiegehirn von Patienten, die zu Lebzeiten eine KMT erhalten haben, bestätigt werden kann. In diesem Zusammenhang scheint es trotz der angedeuteten technischen Schwierigkeiten vielversprechend, die Studie von Unger et al. (1993) zu wiederholen und auf das Cerebellum auszuweiten.

Nach transientscher fokaler cerebraler Ischämie, die hier als exemplarisches Paradigma einer ZNS-Läsion verwendet wurde, wanderten deutlich mehr genetisch markierte Blutzellen in das geschädigte Hirnareal ein, von denen einige zu ramifizierten Mikrogliazellen differenzierten. Mikroglia wird eine Beteiligung bei fast allen Hirnerkrankungen zugeschrieben. Die in dieser Arbeit verwendete Methode der Knochenmarktransduktion könnte sich in Zukunft als relativ wenig invasive Möglichkeit anbieten, auf genetischer Ebene in Erkrankungsprozesse des ZNS einzugreifen bzw. therapeutische Gene in das ZNS einzuschleusen.

7 Literatur

- Aiuti, A.; Slavin, S.; Aker, M.; Ficara, F.; Deola, S.; Mortellaro, A.; Morecki, S.; Andolfi, G.; Tabucchi, A.; Carlucci, F.; Marinello, E.; Cattaneo, F.; Vai, S.; Servida, P.; Miniero, R.; Roncarolo, M. G.; Bordignon, C. (2002). Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* 296: 2410-2413.
- Alliot, F.; Godin, I.; Pessac, B. (1999). Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res Dev Brain Res* 117: 145-152.
- Austyn, J. M.; Gordon, S. (1981). F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol* 11: 805-815.
- Bagley, J.; Aboody-Guterman, K.; Breakefield, X.; Iacomini, J. (1998). Long-term expression of the gene encoding green fluorescent protein in murine hematopoietic cells using retroviral gene transfer. *Transplantation* 65: 1233-1240.
- Banati, R. B.; Hoppe, D.; Gottmann, K.; Kreutzberg, G. W.; Kettenmann, H. (1991). A subpopulation of bone marrow-derived macrophage-like cells shares a unique ion channel pattern with microglia. *J Neurosci Res* 30: 593-600.
- Banati, R. B.; Gehrmann, J.; Schubert, P.; Kreutzberg, G. W. (1993). Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7: 111-118.
- Banati, R. B.; Graeber, M. B. (1994). Surveillance, intervention and cytotoxicity: is there a protective role of microglia? *Dev Neurosci* 16: 114-127.
- Bechmann, I.; Priller, J.; Kovac A.; Böntert, M.; Wehner, T.; Klett, F. F.; Bohsung, J.; Stuschke, M.; Dirnagl, U.; Nitsch, R. (2001). Immune surveillance of mouse brain perivascular spaces by blood-borne macrophages. *Eur J Neurosci* 14: 1651-1658.

- Bierhuizen, M. F.; Westerman, Y.; Visser, T. P.; Dimjati, W.; Wognum, A. W.; Wagemaker, G. (1997). Enhanced green fluorescent protein as selectable marker of retroviral-mediated gene transfer in immature hematopoietic bone marrow cells. *Blood* 90: 3304-3315.
- Brand, A. (1995). GFP in *Drosophila*. *Trends Genet* 11: 324-325.
- Brazelton, T. R.; Rossi, F. M.; Keshet, G. I.; Blau, H. M. (2000). From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290: 1775-1779.
- Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W. W.; Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805.
- Chiang, C. S.; McBride, W. H.; Withers, H. R. (1993). Radiation-induced astrocytic and microglial responses in mouse brain. *Radiother Oncol* 29: 60-68.
- Cicciarello, R.; d'Avella, D.; Gagliardi, M. E.; Albiero, F.; Vega, J.; Angileri, F. F.; D'Aquino, A.; Tomasello, F. (1996). Time-related ultrastructural changes in an experimental model of whole brain irradiation. *Neurosurgery* 38: 772-779.
- Cody, C. W.; Prasher, D. C.; Westler, W. M.; Prendergast, F. G.; Ward, W. W. (1993). Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry* 32: 1212-1218.
- Cormack, B. P.; Valdivia, R. H.; Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173: 33-38.
- de Bruijn, M. F.; Slieker, W. A.; van der Loo, J. C.; Voerman, J. S.; van Ewijk, W.; Leenen, P. J. (1994). Distinct mouse bone marrow macrophage precursors identified by differential expression of ER-MP12 and ER-MP20 antigens. *Eur J Immunol* 24: 2279-2284.

- de Groot, C. J.; Hupples, W.; Sminia, T.; Kraal, G.; Dijkstra, C. D. (1992). Determination of the origin and nature of brain macrophages and microglial cells in mouse central nervous system, using non-radioactive in situ hybridization and immunoperoxidase techniques. *Glia* 6: 301-309.
- del Zoppo, G. J.; Becker, K. J.; Hallenbeck, J. M. (2001). Inflammation after stroke: is it harmful? *Arch Neurol* 58: 669-672.
- Dirnagl, U.; Iadecola, C.; Moskowitz, M. A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22: 391-397.
- Eglitis, M. A.; Mezey, E. (1997). Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4080-4085.
- Feuerstein, G.; Wang, X. (2001). Inflammation and Stroke - Benefits without harm? *Arch Neurol* 58: 672-674.
- Flaris, N. A.; Densmore, T. L.; Molleston, M. C.; Hickey, W. F. (1993). Characterization of microglia and macrophages in the central nervous system of rats: definition of the differential expression of molecules using standard and novel monoclonal antibodies in normal CNS and in four models of parenchymal reaction. *Glia* 7: 34-40.
- Flügel, A.; Hager, G.; Horvat, A.; Spitzer, C.; Singer, G. M.; Graeber, M. B.; Kreutzberg, G. W.; Schwaiger, F. W. (2001). Neuronal MCP-1 expression in response to remote nerve injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 21: 69-76.
- Glass, J. D.; Wesselingh, S. L. (2001). Microglia in HIV-associated neurological diseases. *Microsc Res Tech* 54: 95-105.

- Goldman, S.; Roy, N. (2000). Reply to "Human neural progenitor cells: better blue than green?" *Nat Med* 6: 483-484.
- Hacein-Bey-Abina, S.; Le Deist, F.; Carlier, F.; Bouneaud, C.; Hue, C.; de Villartay, J. P.; Thrasher, A. J.; Wulffraat, N.; Sorensen, R.; Dupuis-Girod, S.; Fischer, A.; Cavazzana-Calvo, M. (2002). Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *NEJM* 346: 1185-1193.
- Hailer, N. P.; Heppner, F. L.; Haas, D.; Nitsch, R. (1998). Astrocytic factors deactivate antigen presenting cells that invade the central nervous system. *Brain Pathol* 8: 459-474.
- Hara, H.; Huang, P. L.; Panahian, N.; Fishman, M. C.; Moskowitz, M. A. (1996). Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 605-611.
- Hess, D. C.; Hill, W. D.; Martin-Studdard, A.; Carroll, J.; Brailer, J.; Carothers, J. (2002). Bone marrow as a source of endothelial cells and NeuN-expressing cells after stroke. *Stroke* 33: 1362-1368.
- Hickey, W. F.; Kimura, H. (1987). Graft-vs-host disease elicits expression of class I and class II histocompatibility antigens and the presence of scattered T lymphocytes in rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 2082-2086.
- Hickey, W. F.; Kimura, H. (1988). Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 239: 290-292.
- Hickey, W. F.; Hsu, B. L.; Kimura, H. (1991). T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* 28: 254-260.
- Hickey, W. F.; Vass, K.; Lassmann, H. (1992). Bone marrow-derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras. *J Neuropathol Exp Neurol* 51: 246-256.

- Hickey, W. F. (1999). Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. *Semin Immunol* 11: 125-137.
- Huang, W. Y.; Aramburu, J.; Douglas, P. S.; Izumo, S. (2000). Transgenic expression of green fluorescence protein can cause dilated cardiomyopathy. *Nat Med* 6: 482-43.
- Iadecola, C. (1997). Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci* 20: 132-139.
- Imai, Y.; Ibata, I.; Ito, D.; Ohsawa, K.; Kohsaka, S. (1996). A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun* 224: 855-862.
- Ito, D.; Imai, Y.; Ohsawa, K.; Nakajima, K.; Fukuuchi, Y.; Kohsaka, S. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, *Iba1*. *Brain Res Mol Brain Res* 57: 1-9.
- Kato, H.; Walz, W. (2000). The initiation of the microglial response. *Brain Pathol* 10: 137-143.
- Kaur, C.; Hao, A. J.; Wu, C. H.; Ling, E. A. (2001). Origin of microglia. *Microsc Res Tech* 54: 2-9.
- Kennedy, D. W.; Abkowitz, J. L. (1998). Mature monocytic cells enter tissues and engraft. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 14944-14949.
- Krall, W. J.; Challita, P. M.; Perlmutter, L. S.; Skelton, D. C.; Kohn, D. B. (1994). Cells expressing human glucocerebrosidase from a retroviral vector repopulate macrophages and central nervous system microglia after murine bone marrow transplantation. *Blood* 83: 2737-2748.

- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19: 312-318.
- Krivit, W.; Sung, J. H.; Shapiro, E. G.; Lockman, L. A. (1995). Microglia: the effector cell for reconstitution of the central nervous system following bone marrow transplantation for lysosomal and peroxisomal storage diseases. *Cell Transplant* 4: 385-392.
- Krivit, W.; Shapiro, E. G.; Peters, E. G.; Peters, C.; Wagner, J. E.; Cornu, G.; Kurtzberg, J.; Wenger, D. A.; Kolodny, E. H.; Vanier, M. T.; Loes, D. J.; Dusenberry, K.; Lockman, L. A. (1998). Hematopoietic stem-cell transplantation in globoid-cell leukodystrophy. *NEJM* 338: 1119-1126.
- Kume, A.; Xu, R.; Ueda, Y.; Urabe, M.; Ozawa, K. (2000). Long-term tracking of murine hematopoietic cells transduced with a bicistronic retrovirus containing CD24 and EGFP genes. *Gene Ther* 7: 1193-1199.
- Lassmann, H.; Zimprich, F.; Vass, K.; Hickey, W. F. (1991). Microglial cells are a component of the perivascular glia limitans. *J Neurosci Res* 28: 236-243.
- Lawson, L. J.; Perry, V. H.; Gordon, S. (1992). Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 48: 405-415.
- Limon, A.; Briones, J.; Puig, T.; Carmona, M.; Fornas, O.; Cancelas, J. A.; Nadal, M.; Garcia, J.; Rueda, F.; Barquinero, J. (1997). High-titer retroviral vectors containing the enhanced green fluorescent protein gene for efficient expression in hematopoietic cells. *Blood* 90: 3316-3321.
- Ling, E. A.; Kaur, C.; Wong, W. C. (1991). Expression of major histocompatibility complex and leukocyte common antigens in amoeboid microglia in postnatal rats. *J Anat* 177: 117-126.

- Ling, E. A.; Wong, W. C. (1993). The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 7: 9-18.
- Lipton, P. (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological Reviews* 79: 1431-1568.
- Liu, H. S.; Jan M. S.; Chou C. K.; Chen P. H.; Ke N. J. (1999). Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem Biophys Res Commun* 260: 712-717.
- Markowitz, D.; Goff, S.; Bank, A. (1988). A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J Virol* 62: 1120-1124.
- Matsumoto, Y.; Fujiwara, M. (1987). Absence of donor-type major histocompatibility complex class I antigen-bearing microglia in the rat central nervous system of radiation bone marrow chimeras. *J Neuroimmunol* 17: 71-82.
- Matzner, U.; Harzer, K.; Learish, R. D.; Barranger, J. A.; Gieselmann, V. (2000). Long-term expression and transfer of arylsulfatase A into brain of arylsulfatase A-deficient mice transplanted with bone marrow expressing the arylsulfatase A cDNA from a retroviral vector. *Gene Ther* 7: 1250-1257.
- Matzner, U.; Hartmann, D.; Lullmann-Rauch, R.; Coenen, R.; Rothert, F.; Mansson, J. E.; Fredman, P.; D'Hooge, R.; De Deyn, P. P.; Gieselmann, V. (2002). Bone marrow stem cell-based gene transfer in a mouse model for metachromatic leukodystrophy: effects on visceral and nervous system disease manifestations. *Gene Ther* 9: 53-63.
- Mezey, E.; Chandross, K. J.; Harta, G.; Maki, R. A.; McKercher, S. R. (2000). Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290: 1779-1782.

- Miranda, S. R.; Erlich, S.; Visser, J. W.; Gatt, S.; Dagan, A.; Friedrich VL Jr; Schuchman,; Schuchman, E. H. (1997). Bone marrow transplantation in acid sphingomyelinase-deficient mice: engraftment and cell migration into the brain as a function of radiation, age, and phenotype. *Blood* 90: 444-452.
- Miranda, S. R.; Erlich, S.; Friedrich VL Jr; Gatt,; Gatt, S.; Schuchman, E. H. (2000). Hematopoietic stem cell gene therapy leads to marked visceral organ improvements and a delayed onset of neurological abnormalities in the acid sphingomyelinase deficient mouse model of Niemann-Pick disease. *Gene Ther* 7: 1768-1776.
- Nakano, K.; Migita, M.; Mochizuki, H.; Shimada, T. (2001). Differentiation of transplanted bone marrow cells in the adult mouse brain. *Transplantation* 71: 1735-1740.
- Okabe, M.; Ikawa, M.; Kominami, K.; Nakanishi, T.; Nishimune, Y. (1997). 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407: 313-319.
- Ono, K.; Takii, T.; Onozaki, K.; Ikawa, M.; Okabe, M.; Sawada, M. (1999). Migration of exogenous immature hematopoietic cells into adult mouse brain parenchyma under GFP-expressing bone marrow chimera. *Biochem Biophys Res Commun* 262: 610-614.
- Padovan, C. S.; Bise, K.; Hahn, J.; Sostak, P.; Holler, E.; Kolb, H. J.; Straube, A. (1999). Angiitis of the central nervous system after allogeneic bone marrow transplantation? *Stroke* 30: 1651-1656.
- Padovan, C. S.; Gerbitz, A.; Sostak, P.; Holler, E.; Ferrara, J. L.; Bise, K.; Straube, A. (2001). Cerebral involvement in graft-versus-host disease after murine bone marrow transplantation. *Neurology* 56: 1106-1108.
- Pawliuk, R.; Eaves, C. J.; Humphries, R. K. (1997). Sustained high-level reconstitution of the hematopoietic system by preselected hematopoietic cells expressing a transduced cell-surface antigen. *Hum Gene Ther* 8: 1595-1604.

- Persons, D. A.; Allay, J. A.; Allay, E. R.; Smeyne, R. J.; Ashmun, R. A.; Sorrentino, B. P.; Nienhuis, A. W. (1997). Retroviral-mediated transfer of the green fluorescent protein gene into murine hematopoietic cells facilitates scoring and selection of transduced progenitors in vitro and identification of genetically modified cells in vivo. *Blood* 90: 1777-1786.
- Persons, D. A.; Allay, J. A.; Riberdy, J. M.; Wersto, R. P.; Donahue, R. E.; Sorrentino, B. P.; Nienhuis, A. W. (1998). Use of the green fluorescent protein as a marker to identify and track genetically modified hematopoietic cells. *Nat Med* 4: 1201-1205.
- Peters, S. O.; Kittler, E. L.; Ramshaw, H. S.; Quesenberry, P. J. (1995). Murine marrow cells expanded in culture with IL-3, IL-6, IL-11, and SCF acquire an engraftment defect in normal hosts. *Exp Hematol* 23: 461-469.
- Poenaru, L. (2001). From gene transfer to gene therapy in lysosomal storage diseases affecting the central nervous system. *Ann Med* 33: 28-36.
- Popovich, P. G.; Hickey, W. F. (2001). Bone marrow chimeric rats reveal the unique distribution of resident and recruited macrophages in the contused rat spinal cord. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 676-685.
- Prasher, D. C.; Eckenrode, V. K.; Ward, W. W.; Prendergast, F. G.; Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111: 229-233.
- Priller, J.; Flügel, A.; Wehner, T.; Böntert, M.; Haas, C. A.; Prinz, M.; Fernandez Klett, F.; Prass, K.; Bechmann, I.; de Boer, B. A.; Frotscher, M.; Kreutzberg, G. W.; Persons, D. A.; Dirnagl, U. (2001a). Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: Use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med* 7: 1356-1361.

- Priller, J.; Persons, D. A.; Klett, F. F.; Kempermann, G.; Kreutzberg, G. W.; Dirnagl, U. (2001b). Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *J Cell Biol* 155: 733-738.
- Raivich, G.; Bohatschek, M.; Kloss, C. U.; Werner, A.; Jones, L. L.; Kreutzberg, G. W. (1999). Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev* 30: 77-105.
- Rio Hortega, P. del (1932). Microglia. In: Penfield, W. (Ed.). *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System, Vol. II*; Hoeber, New York, 481-534.
- Schluter, D.; Meyer, T.; Strack, A.; Reiter, S.; Kretschmar, M.; Wiestler, O. D.; Hof, H.; Deckert, M. (2001). Regulation of microglia by CD4⁺ and CD8⁺ T cells: selective analysis in CD45-congenic normal and *Toxoplasma gondii*-infected bone marrow chimeras. *Brain Pathol* 11: 44-55.
- Schmidtmayer, J.; Jacobsen, C.; Miksch, G.; Sievers, J. (1994). Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: membrane currents. *Glia* 12: 259-267.
- Sievers, J.; Parwaresch, R.; Wottge, H. U. (1994). Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: morphology. *Glia* 12: 245-258.
- Silverman, A. J.; Sutherland, A. K.; Wilhelm, M.; Silver, R. (2000). Mast cells migrate from blood to brain. *J Neurosci* 20: 401-408.
- Spangrude, G. J. (1994). Assessment of Lymphocyte Development in Radiation Bone Marrow Chimeras. *Current Protocols in Immunology*, Unit 4.6.
- Stoll, G.; Jander, S.; Schroeter, M. (1998). Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol* 56: 149-171.

- Stoll, G.; Jander, S. (1999). The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog Neurobiol* 58: 233-247.
- Streit, W. J.; Graeber, M. B.; Kreutzberg, G. W. (1989). Expression of Ia antigen on perivascular and microglial cells after sublethal and lethal motor neuron injury. *Exp Neurol* 105: 115-126.
- Streit, W. J.; Graeber, M. B. (1993). Heterogeneity of microglial and perivascular cell populations: insights gained from the facial nucleus paradigm. *Glia* 7: 68-74.
- Thomas, W. E. (1999). Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells. *Brain Res Brain Res Rev* 31: 42-57.
- Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67: 509-544.
- Unger, E. R.; Sung, J. H.; Manivel, J. C.; Chenggis, M. L.; Blazar, B. R.; Krivit, W. (1993). Male donor-derived cells in the brains of female sex-mismatched bone marrow transplant recipients: a Y-chromosome specific in situ hybridization study. *J Neuropathol Exp Neurol* 52: 460-470.
- Wada, R.; Tiffit, C. J.; Proia, R. L. (2000). Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is suppressed by bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10954-10959.
- Walkley, S. U.; Thrall, M. A.; Dobrenis, K.; Huang, M.; March, P. A.; Siegel, D. A.; Wurzelmann, S. (1994). Bone marrow transplantation corrects the enzyme defect in neurons of the central nervous system in a lysosomal storage disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 2970-2974.
- Wekerle, H.; Linnington, G.; Lassmann, H. M. R. (1986). Cellular immune reactivity within the CNS. *Trends in Neurosciences* 9: 271-277.

- Wu, Y. P.; McMahon, E. J.; Matsuda, J.; Suzuki, K.; Matsushima, G. K.; Suzuki, K. (2001). Expression of immune-related molecules is downregulated in twitcher mice following bone marrow transplantation. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 1062-1074.
- Yenari, M. A.; Dumas, T. C.; Sapolsky, R. M.; Steinberg, G. K. (2001). Gene therapy for treatment of cerebral ischemia using defective herpes simplex viral vectors. *Neurol Res* 23: 543-552.

Abkürzungen

CD	Differenzierungsantigen, engl. cluster determinant
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EGFP	Verstärkte Variante des grünen fluoreszierenden Proteins, engl. enhanced green fluorescent protein
FACS	Fluoreszenz gesteuerte Zellsortierung, engl. Fluorescence-activated cell sorting
FCS	fötales Kälberserum, engl. fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GFP	grünes fluoreszierendes Protein
GZL	Globoidzellen-Leukodystrophie, Krabbe-Krankheit
HIV	Humanes Immunodefizienzvirus
Iba1	ionisiertes Calcium bindendes Adaptermolekül 1
ICAM-1	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1, engl. intercellular cell adhesion molecule 1
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthetase
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
KMT	Knochenmarktransplantation
MCP	Monozyten-Chemoanziehendes Protein, engl. monocyte chemoattractant protein
MHC	Hauptgewebekompatibilitätskomplex, engl. major histocompatibility complex
NaCl	Natriumchlorid, physiologische Kochsalzlösung
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthetase
PBS	phosphatgepufferte natürliche Kochsalzlösung, engl. phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
rHuIL-6	rekombinantes humanes Interleukin 6

rMuIL-3	rekombinantes murines Interleukin 3
rSCF	Stammzellfaktor aus der Ratte, engl. rat stem cell factor
ZKM	Zellkulturmedium
ZNS	Zentralnervensystem

Danksagung

Im Laufe dieser Dissertation habe ich die Laborforschung mit all ihren Höhen und Tiefen kennengelernt. Zum Gelingen des Projektes haben viele Menschen beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Dirnagl danke ich für die Überlassung des Themas und die jederzeit und in jeder Hinsicht vorbildlich gewährte Unterstützung. Gleiches gilt für Herrn PD Dr. Josef Priller, der mich in der alltäglichen Arbeit betreute.

Während der experimentellen Phase habe ich eng mit meinem Freund und Mitdoktoranden Matthias Böntert zusammengearbeitet. In der unmittelbaren Arbeit habe ich vieles von meinem Mitdoktoranden Francisco Fernandez Klett gelernt. Dabei habe ich auch von Vorarbeiten meines Vorgängers, Herrn Matthias Heinze, profitiert. Allen dreien danke ich für die gute Zusammenarbeit in der „AG Grün“.

Herrn Dr. Konstantin Prass spreche ich meinen Dank und meine Anerkennung für die sorgfältig ausgeführten Ischämieoperationen aus.

Frau Dr. Dorette Freyer und Frau Renate Gusinda haben mir das ABC der Zellkultur vermittelt und bei kleinen und großen Problemen mit ihrer Erfahrung Hilfestellung leisten können, wofür ich beiden dankbar bin.

Herrn Dr. Bauke A. de Boer, zur Zeit der Experimente am Deutschen Rheumaforschungszentrum tätig, danke ich für die Einarbeitung in die Durchflusszytometrie, seinem Kollegen Dr. Thoralf Kaiser für die Unterstützung bei der Zellsortierung.

Herrn Dr. Werner Zuschratter vom Institut für Neurobiologie in Magdeburg bin ich dankbar für die dreidimensionale Rekonstruktion einer GFP-exprimierenden Mikrogliazelle.

Herrn PD Dr. Ingo Bechmann vom Institut für Anatomie der Charité spreche ich meinen Dank für produktive Diskussionen im Zusammenhang mit den Themenbereichen Quantifizierung und Immunhistochemie aus.

Der Charité danke ich für ein Forschungsstipendium, ohne welches ich mich diesem Projekt nicht so intensiv hätte widmen können.

Lebenslauf

Tim Wehner

18. Mai 1972

Geboren in Georgsmarienhütte, Landkreis Osnabrück

Eltern: Doris Wehner, technische Zeichnerin

Klaus Wehner, Ingenieur

Schule

1978 – 1982

Grundschule Schleddehausen

1982 – 1984

Orientierungsstufe Dom Osnabrück

1984 – 1991

Gymnasium Carolinum Osnabrück, Abitur am 31. Mai 1991

Zivildienst

Sept. 1991 – Okt. 1992

Krankenpflegehelfer, Marienhospital Osnabrück

Studium der Humanmedizin

Okt. 1992 – März 1994

Universität Kiel, unterbrochen durch eine schwere Erkrankung

April 1994 – April 2001

Universität Witten/Herdecke

Aug. 1997 – Juni 1998

University of Aberdeen, Scotland;

Auslandsstipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes

Mai 1999 – April 2000

Experimenteller Teil der Dissertation in der Abteilung für

Experimentelle Neurologie der Charité, assoziiertes Mitglied im

Graduiertenkolleg 238 „Schadensmechanismen im

Nervensystem“

Mai 2000 – März 2001

Praktisches Jahr

Innere Medizin MetroHealth Medical Center, Cleveland,
Ohio, USA (Prof. G. Richard Olds, M. D.)

Neurologie Klinikum Wuppertal
(Prof. Dr. Johannes Jörg)

Chirurgie Evangelisches Krankenhaus Witten
(PD Dr. Christian Blöchle)

Examina

April 1996	Ärztliche Vorprüfung
April 1997	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
April 1999	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
April 2001	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Juni 1997	USMLE Step 1
Juli 2001	USMLE Step 2 und „Clinical Skills Assessment“
Dezember 2001	USMLE Step 3

Auszeichnungen

1997-2001	Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes
-----------	---

Beruflicher Werdegang

Juli 2001 – Juni 2002	Arzt/Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe „Modellstudiengang“ an der Fakultät für Medizin der Universität Witten/Herdecke (Dr. Wilhelm E. Vermaasen)
Juni 2002	Beginn der Weiterbildung in Neurologie an der Case Western Reserve University / MetroHealth Medical Center (obligatorische “Internship” in Innerer Medizin) und an der Cleveland Clinic Foundation; Cleveland, Ohio, USA

Publikationsliste

- Wehner, T.; Böntert, M.; Eyüpoglu, I.; Prass, K.; Klett, F. F.; Heinze, M.; Bechmann, I.; Nitsch, R.; Kirchhoff, F.; Kettenmann, H.; Dirnagl, U.; Priller J. Bone marrow-derived cells expressing GFP under the control of the *glial fibrillary acidic protein* promoter do not differentiate into astrocytes in vitro and in vivo. *Submitted*.
- Priller, J.; Flügel, A.; Wehner, T.; Böntert, M.; Haas, C. A.; Prinz, M.; Fernandez Klett, F.; Prass, K.; Bechmann, I.; de Boer, B. A.; Frotscher, M.; Kreutzberg, G. W.; Persons, D. A.; Dirnagl, U. (2001). Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: Use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med* 7: 1356-1361.
- Bechmann, I.; Priller, J.; Kovac, A.; Böntert, M.; Wehner, T.; Klett, F. F.; Bohsung, J.; Stuschke, M.; Dirnagl, U.; Nitsch, R. (2001). Immune surveillance of mouse brain perivascular spaces by blood-borne macrophages. *Eur J Neurosci* 14: 1651-1658.

Kongressbeiträge

- Wehner, T.; Böntert, M.; Eyüpoglu, I.; Fernandez, F.; Prass, K.; Bechmann, I.; Nitsch, R.; Kirchhoff, F.; Dirnagl, U.; Priller, J. (November 2000). Bone marrow derived cells differentiate into microglia but not into GFAP-positive astroglia in vitro and in a transgenic mouse model. 30th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans (Poster).
- Wehner, T.; Böntert, M.; Fernandez, F.; Heinze, M.; Prass, K.; Bohsung, J.; de Boer, B.; Priller, J.; Dirnagl, U. (November 1999). Gfp as a tool to investigate the cns invasion of hematogenous cells under physiological and ischemic conditions. European Students Conference, Berlin (Vortrag und Poster).
- Priller, J.; Heinze, M.; Fernandez, F.; Wehner, T.; Böntert, M.; Endres, M.; Prass, K.; de Boer, B.; Dreier, J.; Dirnagl, U. (November 1999). Hematogenous cells express microglial and macroglial markers following cerebral ischemia. 29th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Miami (Poster).

Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Dissertation habe ich selbst ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst. Die von mir benutzten Hilfsmittel und die Literatur habe ich vollständig angegeben. Diese Dissertation ist bislang nicht veröffentlicht, und sie wurde noch von keiner anderen Fakultät abgelehnt.

Berlin, den